

Aus der Klinik für Neurochirurgie,  
der medizinischen Fakultät Charité,  
der Humboldt-Universität zu Berlin,  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. R. Lanksch

## DISSERTATION

# **Evaluation des tierexperimentellen Modells einer traumatischen kortikalen Kontusion (Controlled Cortical Impact Injury) für Therapiestudien**

Zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)  
vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité

Ulrich-Wilhelm N. Thomale  
aus Braunschweig

Dekan: Prof. Dr. med. J. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. U. Dirnagl  
2. Prof. Dr. A.W. Unterberg  
3. Prof. Dr. Dr. L. Schilling

eingereicht: 01.10.2000

Datum der Promotion: 13.07.2001

## ZUSAMMENFASSUNG

*Fragestellung:* Das Modell der kortikalen Kontusion (Controlled Cortical Impact Injury) soll in der vorliegenden Arbeit für den Einsatz in Therapiestudien evaluiert werden. Dafür wird der posttraumatische Schaden dieses Modells charakterisiert und quantifiziert. Darüber hinaus wird exemplarisch die Wirkung einer neuen potentiell neuroprotektiven Substanz auf den posttraumatischen Schaden untersucht.

*Material und Methoden:* Für die Untersuchungen werden 89 Sprague Dawley Ratten verwendet. Das Trauma wird über einen pneumatisch gesteuerten Schlagbolzen mit einer Geschwindigkeit von 7,4 m/s, einer Eindringtiefe von 2 mm und einer Kontaktzeit von 0,3 Sekunden auf den links parieto-temporalen Kortex unter Überwachung der Vitalparameter (MAD, aPO<sub>2</sub>, aPCO<sub>2</sub>, pH) appliziert. 23 Stunden nach Trauma erfolgt eine neurologische Untersuchung. Bei allen Tieren werden 24 Stunden nach Trauma die Gehirne entnommen. Zur Quantifizierung des posttraumatischen Hirnödems erfolgt die Bestimmung des Wassergehalts und der Hemisphärenschwellung gravimetrisch. Das Kontusionsvolumen wird anhand der TTC-Färbung morphometrisch bestimmt. Die Extravasation von Evans Blue als Indikator des vasogenen Hirnödems wird spektralfotometrisch quantifiziert. Die histologische Charakterisierung erfolgt anhand der HE-Färbung zur Begutachtung der Neurone, der Bielschowsky-Färbung zur Beurteilung des axonalen Schadens und der Fluoreszenzmikroskopie zur morphologischen Charakterisierung des vasogenen Hirnödems. In der Therapiestudie mit dem 5 HT<sub>1A</sub>-Agonisten Bay X 3702 werden die Vitalparameter während der Versuchsdurchführung überwacht. 24 Stunden nach Trauma erfolgt die Bestimmung des Kontusionsvolumens, des posttraumatischen Wassergehalts und der Hemisphärenschwellung.

*Ergebnisse:* Das Monitoring der Vitalparameter während des Traumas ergibt keine signifikanten Veränderungen. Bei der neurologischen Untersuchung zeigen sich Einschränkungen v.a. in der Spontanaktivität und der Balancierfähigkeit der Tiere. Der posttraumatische Wassergehalt der linken traumatisierten Hemisphäre beträgt  $82,5 \pm 0,12$  % und war gegenüber der kontralateralen Hemisphäre ( $79,98 \pm 0,07$  %) signifikant erhöht. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede des Wassergehalts der Hemisphären bei unbehandelten und scheinoperierten Tieren gegenüber der kontralateralen rechten Hemisphäre

der traumatisierten Tiere. Die posttraumatische Hemisphärenschwellung beträgt  $14,3 \pm 1,2 \%$ . Bei der Quantifizierung der Evans Blue-Extravasation als Indikator des vasogenen Hirnödems zeigt sich in der traumatisierten Hemisphäre eine signifikant höhere Konzentration von Evans Blue ( $47,28 \pm 11,8 \text{ ng/mg TG}$ ). Anhand der TTC-Färbung ist das Kontusionsvolumen mit  $58,89 \pm 9,1 \text{ mm}^3$  quantifiziert worden. Die histologische Untersuchung der Kontusion zeigt mittels der HE-Färbung eine auf den Kortex beschränkte hämorrhagische Nekrose. Die Bielschowsky-Färbung weist einen lokal begrenzten axonalen Schaden im Bereich des perikontusionellen Gewebes nach. Die Fluoreszenzmikroskopie der Evans Blue-Verteilung zeigt den Indikator des Blut-Hirn-Schrankenschadens im Randbereich der Kontusion, im perikontusionellen Gewebe und im Marklager unterhalb der Kontusion.

Bei der mit dem 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten Bay X 3702 durchgeführten Therapiestudie wird eine signifikante Abnahme des arteriellen Blutdrucks mit Senkung des Blutdrucks um 21 % nach Trauma und Injektion der Substanz im Vergleich zur Plazebo-Gruppe gemessen. Das Kontusionsvolumen ist in der Bay X 3702-Gruppe mit  $126 \pm 21,8 \text{ mm}^3$  um 116 % größer als in der Plazebo-Gruppe. Es läßt sich eine signifikante Korrelation zwischen dem hypotensiven Effekt und der Ausdehnung des Kontusionsvolumens nachweisen. Der posttraumatische Wassergehalt und die Hemisphärenschwellung zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen.

*Schlußfolgerung:* Das Controlled Cortical Impact Injury (CCII) imitiert einige wichtige Aspekte des menschlichen Schädel-Hirn-Traumas. Der posttraumatische Schaden ist reproduzierbar und quantifizierbar. Die Therapiestudie mit dem 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten Bay X 3702 zeigt keinen positiven Effekt auf den posttraumatischen Hirnschaden nach CCII, was am ehesten auf den blutdrucksenkenden Effekt der Substanz zurückzuführen ist. Es kann gezeigt werden, daß das CCII als Modell der fokalen Kontusion für Therapiestudien geeignet ist.

## ABSTRACT

*Objective:* In a new model of focal cortical contusion (Controlled Cortical Impact Injury, CCII) the posttraumatic lesion should be characterized and quantified. To evaluate effects of potential neuroprotective agents on posttraumatic alterations, a representative study with a 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> (5-HT<sub>1A</sub>)-receptor agonist was performed.

*Materials and Methods:* In 86 Sprague Dawley rats a left temporo-parietal contusion was applied using a pneumatic driven impactor with a velocity of 7,7 m/sec and a penetration depth of 2 mm. Mean arterial blood pressure (MABP) and arterial blood gases (ABG) were monitored continuously. 23 h following CCII rat were examined neurologically. In all animals brains were removed 24 hours after contusion. Posttraumatic hemispheric swelling and water content were determined gravimetrically. Using the triphenyltetrazoliumchloride (TTC) staining contusion volume was measured planimetrically. For histological characterization hematoxylin/eosin staining was used to evaluate posttraumatic necrosis. In Bielschowsky staining axonal injury could be observed. Extravasation of Evans blue was quantified spectrophotometrically and characterized morphologically using fluorescence microscopy. The effect of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist Bay X 3702 on contusion volume and brain edema following CCII was determined.

*Results:* MABP and ABG were within normal limits before and following CCII. Neurological examination showed deficits in motility and beam balance task, respectively. Posttraumatic hemispheric water content increased significantly after contusion ( $82.5 \pm 0.12\%$ ) versus contralateral hemisphere ( $79.8 \pm 0.08\%$ ). No significant changes in water content resulted after sham operation. Posttraumatic swelling was  $14.3 \pm 1.2\%$ . Spectrophotometrically, concentration of extravasated Evans Blue was  $47.3 \pm 11.8$  ng/mg dry weight. Contusion volume was  $58.9 \pm 9.1$  mm<sup>3</sup>. Histologically, a hemorrhagic necrosis was observed following CCII. Axonal injury was found in pericontusional area, only. Evans Blue was detected pericontusionally in the ipsilateral extra- and intracellular space.

Bay X 3702 had no significant effect on posttraumatic hemispheric swelling and water content. In contrast to neuroprotective effect, shown following focal and global ischemia Bay X 3702 administration resulted in significant increase of contusion volume to  $126 \pm 21.8$  mm<sup>3</sup>, versus placebo group ( $58.6 \pm 7.5$  mm<sup>3</sup>) following CCII. MABP showed significant decreased values after injection of Bay X 3702 up to 30 Minutes following trauma. A significant correlation could be shown between decrease of MABP and increase of contusion volume.

*Conclusion:* The Controlled Cortical Impact Injury represents important aspects of human focal traumatic brain injury. The posttraumatic lesion is reproduceable and quantifiable. Although a neuroprotective effect of the 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> agonist Bay X 3702 could not be verified the role of posttraumatic hypotension on secondary brain damage is emphasized.

Due to relevant and comparable quantitative parameters after Controlled Cortical Impact Injury effects of potential neuroprotective agents can accurately be proved in this model.

Schlagwörter:

5-Hydroxytryptamin, Kontusion, Neuroprotektion, Schädel-Hirn-Trauma, Controlled Cortical Impact Injury

Keywords:

5-Hydroxytryptamine, contusion, neuroprotection, traumatic brain injury, Controlled Cortical Impact Injury.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>10</b>
1.1	<i>FRAGESTELLUNG DER ARBEIT:</i> .....	13
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>14</b>
2.1	VERSUCHSTIERE .....	14
2.2	CONTROLLED CORTICAL IMPACT INJURY .....	14
2.3	PRÄPARATION DER VERSUCHSTIERE .....	16
2.4	NEUROLOGISCHE UNTERSUCHUNG .....	19
2.5	QUANTIFIZIERUNG VON HEMISPHÄRENSCHWELLUNG UND WASSERGEHALT .....	22
2.6	SCHEINOPERATIONEN UND KONTROLLTIERE .....	23
2.7	TTC-FÄRBUNG .....	23
2.8	EXTRAVASATION VON EVANS BLUE.....	24
2.8.1	<i>Fotometrische Quantifizierung</i> .....	25
2.9	HISTOLOGIE.....	26
2.9.1	<i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i> .....	26
2.9.2	<i>Bielschowsky-Färbung</i> .....	26
2.9.3	<i>Fluoreszenzmikroskopie</i> .....	27
2.10	THERAPIESTUDIE MIT DEM 5-HT <sub>1A</sub> -REZEPTOR-AGONISTEN BAY X 3702 .....	28
2.10.1	<i>Substanz (Bay X 3702) und Placebo</i> .....	28
2.10.2	<i>Versuchsdurchführung</i> .....	28
2.11	STATISTISCHE METHODEN .....	30
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>32</b>
3.1	KINETIK DES BOLZENSCHLAGES.....	32
3.2	POSTTRAUMATISCHE UNTERSUCHUNGEN IN VIVO.....	34
3.2.1	<i>Mittlerer arterieller Blutdruck</i> .....	34
3.2.2	<i>Arterielle Blutgasanalyse</i> .....	34
3.2.3	<i>Neurologische Untersuchung</i> .....	35
3.3	POSTTRAUMATISCHE VERÄNDERUNGEN DES HIRNGEWEBES .....	37
3.3.1	<i>Makroskopische Beschreibung des Traumas</i> .....	37
3.3.2	<i>Hemisphärenschwellung und Wassergehalt</i> .....	39
3.3.3	<i>Evans Blue-Extravasation</i> .....	41
3.3.4	<i>Kontusionsvolumen</i> .....	44
3.4	HISTOLOGIE.....	46
3.4.1	<i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i> .....	46
3.4.2	<i>Bielschowsky-Färbung</i> .....	48
3.4.3	<i>Fluoreszenzmikroskopie</i> .....	49
3.5	THERAPIESTUDIE MIT DEM 5-HT <sub>1A</sub> -REZEPTOR-AGONISTEN BAY X 3702 .....	50
3.5.1	<i>Arterielle Blutgasanalyse</i> .....	50
3.5.2	<i>Blutdruckreaktion</i> .....	51
3.5.3	<i>Kontusionsvolumen</i> .....	55
3.5.4	<i>Hemisphärenschwellung und Wassergehalt</i> .....	56
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>60</b>
4.1	MODELLE ZUR IMITATION DES SCHÄDEL-HIRN-TRAUMAS.....	60
4.1.1	<i>Modell der kortikalen Kälteläsion</i> .....	61
4.1.2	<i>Weight Drop-Modell</i> .....	62
4.1.3	<i>Fluid Percussion-Modell</i> .....	63
4.1.4	<i>Controlled Cortical Impact Injury</i> .....	65
	<b>Subarachnoidalblutung</b> .....	67
4.1.5	<i>Handhabung des Modells</i> .....	67
4.1.6	<i>Narkose</i> .....	69

4.2	HIRNÖDEM .....	70
4.2.1	<i>Vasogenes Hirnödem</i> .....	71
4.2.2	<i>Zytotoxisches Hirnödem</i> .....	74
4.2.3	<i>Hirnödem beim Controlled Cortical Impact Injury</i> .....	76
4.3	ÖDEMRESOLUTION .....	78
4.4	PATHOMORPHOLOGIE .....	80
4.4.1	<i>Kontusionsvolumen</i> .....	80
4.4.2	<i>Zelluntergang</i> .....	81
4.4.3	<i>Axon-Schaden</i> .....	87
4.5	ANWENDUNG .....	88
4.5.1	<i>Therapie des Schädel-Hirn-Traumas</i> .....	88
4.5.2	<i>Therapiestudie mit einem 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonisten</i> .....	91

Meinen Eltern gewidmet



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Π	osmotischer Druck	Lp	hydraulische Leitfähigkeit
μg	Mikrogramm	M	molare Lösung (1mol/l)
μl	Mikroliter	M.	Muskulus
μm	Mikrometer	m/s	Meter/Sekunde
°C	Grad Celsius	MAD	mittlerer arterieller Blutdruck
A.	Arteria	Mg	Magnesium
AANS	American Association of Neurological Surgeons	Min.	Minute
Abb.	Abbildung	ml	Milliliter
ADC	apparent water diffusion coefficient	mm	Millimeter
AMPA	αAmino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolprionat	mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
aPCO <sub>2</sub>	arterieller Kohlendioxid-Partialdruck	MRT	Magnetresonanztomographie
aPO <sub>2</sub>	arterieller Sauerstoff-Partialdruck	ms	Millisekunden
atm	Atmosphären	n	Anzahl der Versuchstiere
ATP	Adenosintriphosphat	N.	Nervus
BHS	Blut-Hirn-Schranke	N <sub>2</sub>	Stickstoff
bzw.	beziehungsweise	Na	Natrium
Ca	Kalzium	NaCl	Natriumchlorid
ca.	circa	ng	Nanogramm
CCII	Controlled Cortical Impact Injury	nm	Nanometer
CCT	kraniales Computertomogramm	NMDA	N-methyl-D-aspartat
cm	Zentimeter	Nn.	Nervi
CPP	zerebraler Perfusionsdruck	NO	Stickoxyl
CT	Computertomogramm	OH	Hydroxyl
d.h.	das heißt	OH-DPAT	8-Hydroxy-2-(di-N,N-n-propylamino) tetralin
DGNC	Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie	P	hydrostatischer Druck
DNA	Desoxiribonukleinsäure	p	Signifikanzniveau
DWI	diffusionsgewichtete Bildgebung	pH	Wasserstoffionenkonzentration (-log[H <sup>+</sup> ])
EB	Evans Blue	r	Korrelationskoeffizient
EBIC	European Brain Injury Consortium	s	Sekunde
Fa.	Firma	s.o.	siehe oben
FG	Feuchtgewicht	s.u.	siehe unten
ggf.	gegebenenfalls	SEM	Standardfehler der Mittelwerte
H	Wasserstoff	SHT	Schädel-Hirn-Trauma
HAT	Hydroxytryptamin	sog.	sogenannt
HE	Hämatoxilin-Eosin	Std.	Stunde
i.m.	intramuskulär	STD	Standardabweichung
i.v.	intravenös	Tab.	Tabelle
ICP	intrakranieller Druck	TG	Trockengewicht
Inj.	Injektion	TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
IP3	Inositoltriphosphat	TUNEL	in situ dUridintriphosphat end labeling
Jv	Flussgradient des Ödem-Exudats	U/s	Umdrehungen pro Sekunde
K	Kalium	u.a.	unter anderem
Kap.	Kapitel	V.	Vena
kg	Kilogramm	v.a.	vor allem
KG	Körpergewicht	vs	versus
l	Liter	z.B.	zum Beispiel

## 1

## EINLEITUNG

”Das Trauma ist das am meisten unterschätzte öffentliche Gesundheitsproblem. Seine Erforschung bietet ungeahnte Möglichkeiten zur Verringerung von Morbidität und Mortalität mit der Aussicht, durch moderate Investitionen erhebliche Verbesserungen zu erzielen.” So heißt es im Bericht der Canadian National Academy of Science, 1985. Diese Äußerung beruhte auf der Diskrepanz zwischen der Anzahl verunfallter Patienten und der mangelnden Kenntnis von Therapierichtlinien, welche das klinische Endergebnis nachweislich verbessern. Das Zitat trifft ebenso für das schwere Schädel-Hirn-Trauma (SHT) zu. Erst in jüngster Zeit konnten Richtlinien entwickelt werden, dieses Krankheitsbild effektiver zu behandeln.

Epidemiologisch ist das Trauma in allen industrialisierten Ländern der Welt im Lebensalter von 20-40 Jahren die wichtigste Ursache für Mortalität und Morbidität. Bei ca. 30% aller Traumen mit tödlichem Ausgang spielt das SHT dabei eine wichtige Rolle (Collins, 1990). In Deutschland liegen keine genauen epidemiologischen Daten über die Häufigkeit sowie die Schwere von Schädel-Hirn-Traumen vor. Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes in Wiesbaden wurden 1994 285000 Patienten entweder wegen intrakranieller Verletzungen oder wegen Schädelfrakturen hospitalisiert. Die Inzidenz des SHT aller Schweregrade entspricht demnach ca. 200-300 Patienten auf 100000 Einwohner pro Jahr. (Statistisches Bundesamt Wiesbaden, 1995). Aufgrund einer 1994 durchgeführten Umfrage an neurochirurgischen Kliniken der Bundesrepublik Deutschland kann davon ausgegangen werden, daß nur ca. 5000 Patienten pro Jahr mit schwerem SHT von Neurochirurgen (mit)betreut werden (Unterberg und Lanksch, 1994). Die Mortalität bei schwer Schädel-Hirn-traumatisierten Patienten liegt laut Angaben einer Studie der amerikanischen National Traumatic Coma Data Bank (NTCDB) mit insgesamt 746 Patienten bei 36%. Weitere 21% dieses Patientenkollektives waren vegetativ, oder durch ein schweres neurologisches Defizit schwer behindert (Marshall et al., 1991).

In den letzten Jahren ist verstärkt versucht worden, die Therapie des SHT zu standardisieren, um eine Verbesserung der Morbidität und Mortalität zu erreichen. In den Vereinigten Staaten, Europa und Deutschland sind in den Jahren 1995-1997 Therapierichtlinien der Association of

American Neurological Surgeons (AANS), des European Brain Injury Consortiums (EBIC) und der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) zur Behandlung von schwer Schädel-Hirn-traumatisierten Patienten veröffentlicht worden (Bullock et al., 1995; Jantzen und Piek, 1997; Maas et al., 1997). Sie basieren auf einer systematische Auswahl und Bewertung bis dahin veröffentlichter Therapiestudien. Nach diesen Therapierichtlinien ist das Patienten-Management v.a. darauf ausgerichtet, sekundäre Komplikationen nach SHT zu verhindern. Es legt entsprechende Vorgaben für die intensivmedizinische und operative Therapie folgender Punkte fest: respiratorische und zirkulatorische Stabilisation des Patienten, Vermeidung von Hypoxie, Hypotension, Hyper- und Hypokapnie, Hyperthermie, Hyper- und Hypoglykämie, Hybernatriämie, Behandlung des intrakraniellen Drucks, operative Entlastung von Raumforderungen. Eine Verbesserung und erhöhte Verfügbarkeit der neurotraumatologischen Primär- und Sekundärversorgung ist Voraussetzung für die erfolgreiche und breite Anwendung dieser Therapierichtlinien.

Für die Entwicklung neuer Therapieverfahren ist das Verständnis pathophysiologischer Vorgänge nach Schädel-Hirn-Trauma wichtig. Die Grundlage hierfür ist das Konzept der Unterscheidung zwischen primärem und sekundärem Hirnschaden. Der zerebrale Primärschaden ist die Läsion, verursacht durch die traumatisch bedingte, mechanische Einwirkung auf das Hirngewebe. Diese ist therapeutisch nicht zu beeinflussen. Der Sekundärschaden ist der durch extra- oder intrakranielle Ursachen verzögert einsetzende Zelluntergang. Als Ursachen kommen im Rahmen des Krankheitsbildes auftretende klinische Komplikationen oder im Gewebe ablaufende pathophysiologische Kaskaden in Frage. Als häufig bei polytraumatisierten Patienten auftretende klinische Komplikationen sind Hypoxie oder arterielle Hypotension zu nennen. Die durch den Primärschaden im Gewebe ausgelösten Kaskaden sind die unkontrollierte Freisetzung und Wirkung von sog. Mediatorsubstanzen wie z.B. exzitatorischen Aminosäuren wie Glutamat, freie Radikale, Stickoxyd, Arachidonsäure und andere inflammatorische Mediatorsubstanzen wie Zytokine, die an der Ausbildung des posttraumatischen Sekundärschadens mitbeteiligt sind. Dieser mediatorvermittelte Sekundärschaden kann durch das Auftreten systemischer arterieller Hypotension oder Hypoxie verstärkt werden.

Die Beeinflussung solcher mediatorvermittelten Kaskaden ist das Ziel der sog. "neuroprotektiven" Therapie. Trotz einer großen Anzahl von vielversprechenden Ergebnissen

aus experimentellen und klinischen Studien ist es bis heute nicht gelungen, eine neuroprotektive Therapie, d.h. präventiven Zellschutz vor mediatorvermitteltem Zelluntergang zu etablieren. Die erwähnten Therapierichtlinien des schweren SHT beinhalten neuroprotektive Ansätze bestenfalls indirekt. So ist z.B. gezeigt worden, daß das Osmodiuretikum Mannitol und das Barbiturat Thiopental neuroprotektive Eigenschaften durch die Verhinderung der Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen besitzen (Kassell et al., 1980). Der eigentliche therapeutische Ansatz dieser Substanzen ist jedoch rein symptomatisch und nicht präventiv, nämlich die Senkung des intrakraniellen Drucks. So ist die Identifikation und Etablierung von neuroprotektiven Substanzen zur Prävention des mediatorvermittelten Zelluntergangs für SHT Patienten nach wie vor eine Herausforderung.

Zum besseren Verständnis des SHT dient die experimentelle Neurotraumatologie als Grundlage und Ergänzung des Verständnisses von biomechanischen und pathophysiologischen Folgen eines SHT. Die ersten größeren Studien wurden mit Primaten von Denny-Brown und Russel 1945 publiziert. Die Untersuchungen verglichen die Auswirkungen eines reproduzierbaren Einschlages sowohl auf den frei beweglichen als auch den befestigten Kopf von Affen. Er konnte zeigen, daß der frei bewegliche Kopf, der einer Beschleunigung ausgesetzt war, einen stärkeren Schaden erlitt als der unbewegliche. Damit wurde die Bedeutung der Beschleunigung des Hirngewebes für die Entstehung des Hirnschadens nachgewiesen (Denny-Brown, 1945; Denny-Brown und Russel, 1945). Gurdjian und Mitarbeiter bestimmten in den 50er Jahren anhand eines den frei beweglichen Kopf eines Primaten treffenden Gewichtes den Schwellenwert der Traumastärke, bei dem die Entstehung von Koma, Kontusionen und Contrecoup-Kontusionen verursacht wird (Gurdjian et al., 1954). Ommaya und Mitarbeiter untersuchten in einem ähnlichen Modell erstmalig die Auswirkungen des Traumas auf den intrakraniellen Druck, andere systemisch-physiologische Parameter, den zerebralen Metabolismus, die histopathologischen Veränderungen und das neurologische Verhalten der traumatisierten Primaten (Ommaya et al., 1966). In der weiteren Entwicklung verließ man die Primatenforschung und es wurden vermehrt Nager als Versuchstiere eingesetzt. 1958 wurde von Klatzo das Modell der kortikalen Kältenekrose bei der Ratte vorgestellt, und 1965 beschrieb Lindgren erstmals das Fluid Percussion-Modell für das Kaninchen (Klatzo et al., 1958; Lindgren und Rinder, 1965). Diese Modelle trugen entscheidend zum Verständnis von Mediatoren des zerebralen Hirnschadens bei.

Bei der Testung von neuroprotektiven Substanzen im Rahmen des SHT ist die Vielschichtigkeit dieses Krankheitsbildes zu berücksichtigen. Wichtige Teilaspekte des SHT sind die fokale Kontusion, das Hirnödem, die intrakranielle Blutung, die Perfusionsstörung und der mechanische Nervenfaserschaden (diffuser Axonschaden). Bei Patienten liegen diese Teilaspekte kombiniert in jeweils unterschiedlicher Ausprägung vor. Diese Teilaspekte sind therapeutisch unterschiedlich zugänglich und können tierexperimentell in verschiedenen Modellen imitiert werden. Dafür werden die Modelle der fokalen oder globalen Ischämie (Smith et al., 1984; Tamura et al., 1981) und die Modelle des subduralen oder intrazerebralen Hämatoms (Bullock et al., 1984; Miller et al., 1990) in der Schädel-Hirn-Trauma-Forschung eingesetzt. In jüngster Zeit sind zwei weitere Trauma-Modelle entwickelt worden, die an Bedeutung gewonnen haben: das Weight Drop-Modell (Marmarou et al., 1994) und das Controlled Cortical Impact Injury-Modell (Dixon et al., 1991; Lighthall, 1988). Alle Modelle dienen der Erforschung von pathophysiologischen Mechanismen, die an der Entstehung des zerebralen Sekundärschadens beteiligt sind.

### 1.1 *Fragestellung der Arbeit:*

Das von Lighthall und Dixon entwickelte Controlled Cortical Impact Injury ist ein neues Modell der kortikalen Kontusion (Dixon et al., 1991; Lighthall, 1988). In dem ersten Teil dieser Arbeit wird die Handhabung dieses Modells beschrieben. Teilaspekte des posttraumatischen Hirnschadens, die durch dieses Modell entstehen, werden charakterisiert und quantifiziert. Im zweiten Teil wird eine Therapiestudie mit einer exemplarisch gewählten, potentiell neuroprotektiven Substanz durchgeführt. Es soll die Frage beantwortet werden, ob dieses tierexperimentelle Modell für den Einsatz von Therapiestudien geeignet ist.

## 2

## MATERIAL UND METHODEN

## 2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Sprague Dawley Ratten ( $n = 89$ ; Fa. Charles River Deutschland, Sulzfeld) mit einem Gewicht von 250-350 g verwendet.

## 2.2 Controlled Cortical Impact Injury

Das Controlled Cortical Impact Injury (CCII) wurde unter technischer Leitung von James Lighthall am Biomedical Science Department der General Motors Laboratorien, USA, entwickelt, am Bioengineering Department des Medical College of Virginia realisiert und unter der wissenschaftlichen Leitung von Edward Dixon bei der Ratte erstmals angewendet (Dixon et al., 1991; Lighthall, 1988). Das Gerät ist in den Abbildungen 2.1. und 2.2. dargestellt. In der folgenden Beschreibung sind die einzelnen Untereinheiten des Modells mit Nummern beziffert, die auf den Abbildungen wiederzufinden sind.

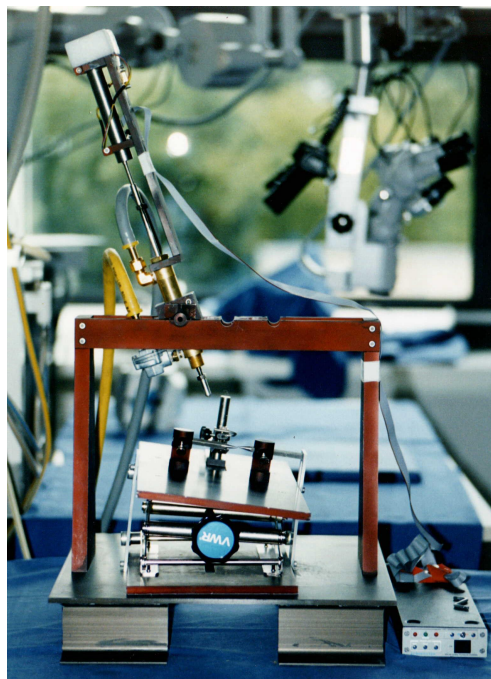


Abb. 2.1.: Die Kontusionseinheit (1) des Controlled Cortical Impact Injury (CCII) mit Fixationstisch und Kontusionsschlitten

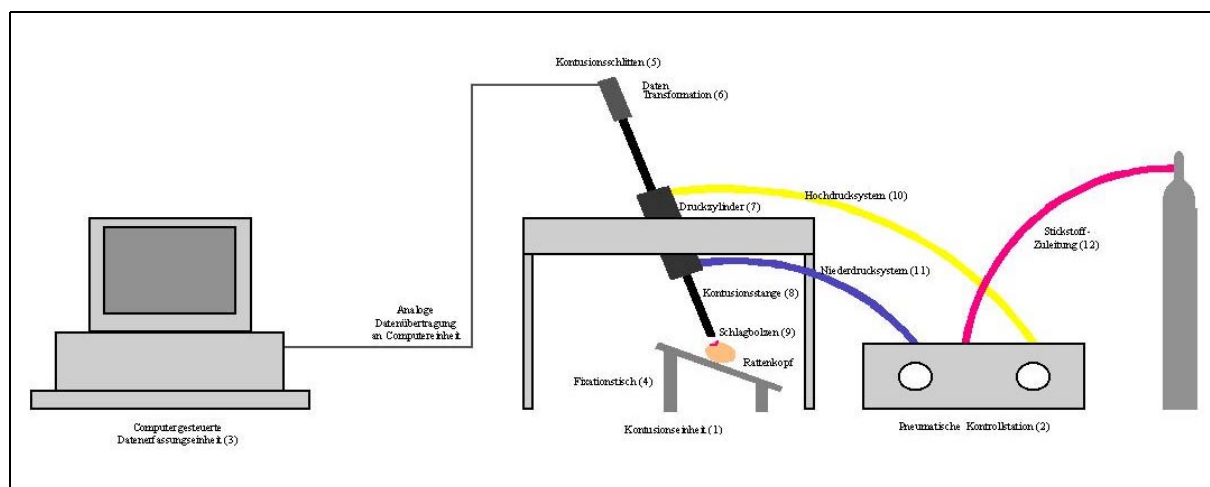


Abb. 2.2.: Schematische Darstellung der Funktionseinheiten des CCII: Kontusionseinheit (1) bestehend aus Fixationstisch (4) und einem im Rahmen fixierten Kontusionsschlitten (5) [Mitte]. Pneumatische Kontrollstation (2) mit Stickstoffzuleitung [rechts]. Computergesteuerte Datenerfassungseinheit (3) [links].

Das Gerät ist funktionell aufgedgliedert in eine Kontusionseinheit (1), eine pneumatische Kontrollstation (2) und eine computergesteuerte Datenerfassungseinheit (3). Die Kontusionseinheit besteht aus einem Fixationstisch (4) und den an einem Stahlrahmen fixierten Kontusionsschlitten (5). Der Fixationstisch ist höhenverstellbar, in der Oberflächenneigung variabel sowie im ganzen verschieblich. Auf ihm ist eine stereotaktische Halterung montiert, in den die Versuchstiere nach chirurgischer Präparation fixiert werden. Der Kontusionsschlitten ist an einem Stahlrahmen über dem Tisch im seitlichen Winkel regulierbar montiert. Er ist aufgebaut aus einer analogen Daten-Transformationseinheit (6), einem Druckzylinder (7), einer Kontusionsstange (8) und einem Schlagbolzen (9). Die Kontusionsstange (8) ist 19,75 mm lang. Am unteren Ende ist der Schlagbolzen (9) in einem Gewinde montiert. Er ist im Durchmesser 7 mm dick und besitzt eine konvexe Oberfläche, die zum Zeitpunkt des Traumas auf die Dura trifft. Das Gewinde dient zur Höhenregulierung des Schlagbolzens und ist mit 1mm Höhenverschiebung pro Umdrehung genormt. Dadurch ist eine genaue Einstellung der Eindringtiefe möglich. Die endgültige Position kann mit einer gegenläufigen Mutter fixiert werden. Die Kontusionsstange mündet in der Mitte in einem Druckzylinder (7). Sie ist linear über 5cm frei beweglich. Der Zylinder ist in zwei Druckkammern unterteilt. Aus der pneumatischen Kontrollstation nehmen diese Kammern über zuführende Schläuche kurzandauernde Druckveränderungen auf. Dadurch wird die Bewegung auf die Kontusionsstange übertragen. Die pneumatische Kontrollstation (2) ist

durch Schläuche über ein Hochdrucksystem (10) mit dem oberen Teil des Druckzylinders (7) und über ein Niederdrucksystem (11) mit dem unteren Teil des Zylinders verbunden. Das Hochdrucksystem (10) verursacht die schnelle Abwärtsbewegung der Kontusionsstange und das Niederdrucksystem (11) die langsamere Aufwärtsbewegung. Über einen dritten Druckschlauch (12) bezieht das System als Druckmedium hochgereinigten Stickstoff (PLUS 5.0, N<sub>2</sub> 99,9% / Fa. AGA Gas GmbH, Hamburg). Die Einstellung verschiedener Druckstufen im Hoch- bzw. im Niederdrucksystems an der Kontrollstation ermöglicht die Wahl von unterschiedlichen Schlaggeschwindigkeiten. Der Hochdruck ist in den hier beschriebenen Versuchen mit 100 pounds per square inch (psi), der Niederdruck mit 8 psi festgelegt. 100 psi entsprechen 5,3 bar. Des Weiteren wird durch Einstellung variabler Auslösezeiten der Druckfreisetzung die Kontaktzeit des Bolzens mit der Dura reguliert. Der Schlag wird mit einer magnetischen Steuerung ausgelöst.

Das obere Ende der Kontusionsstange ist mit der analogen Daten-Transformationseinheit (6; Fa. R.C. Electronics, Texas, USA) verbunden. Die analogen Daten der Schlagbewegung werden an die computergesteuerten Datenerfassungseinheit (3) weitergeleitet. Durch Registrierung der Position des Bolzens kann die Geschwindigkeit der Bolzenbewegung überwacht werden. Mit der von Windows gestützten LabView Software (Fa. National Instruments, Texas, USA) ist eine spezielle Oberfläche erstellt worden (Velocity Data Acquisition for CCII, Autor: T. Bardt, 1995), die in 3 scans/ms die Position des Bolzens in Beziehung zur Zeit aufzeichnet. Aus den erfaßten Daten kann die Geschwindigkeit des Bolzens in m/s sowie die Kontaktzeit des Bolzens mit der Dura berechnet werden.

### 2.3 Präparation der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden mit Äther kurzernarkotisiert und die weitere Narkose mit einer intramuskulären Xylazin/Ketamin Injektion (10/40 mg/kg KG in 2 ml/kg KG) in den linken Hinterlauf (Ketanest<sup>®</sup>, Fa. Parke, Davis & Co Berlin; Rompun<sup>®</sup>, Fa. Bayer AG, Leverkusen) fortgeführt. Sie wurde ggf. durch weitere i.v. Injektionen (0.2/8 mg/kg KG) aufrechterhalten.

Zunächst wurden die rechte Vena jugularis externa und die rechte Arteria femoralis präpariert und mit Polyethylenkathetern kanüliert. Der venöse Zugang diente der Applikation von Narkotika während des gesamten Versuchs. Der arterielle Blutdruck wurde fortlaufend bis 40



Minuten nach Trauma mit einer Transpac-Einheit (Fa. Abbott, Wiesbaden) gemessen. Direkt vor sowie ca. 15 Minuten nach Trauma wurden arterielle Blutproben zur Bestimmung von arteriellen  $PO_2$ ,  $PCO_2$  ( $aPO_2$ ,  $aPCO_2$ ) und pH entnommen.

Zur Trepanation des Schädels sowie zur späteren Induktion des Traumas wurde der Kopf der Tiere in der Halterung des Fixationstisches eingespannt. Unter zusätzlicher Lokalanästhesie mit 0,5 ml 2 %igem Lidocain (Fa. Braun AG, Melsungen) wurde die Kopfhaut in der Medianlinie zwischen Augen und Ohren über eine Länge von ca. 3 cm inzidiert. Ein Entlastungsschnitt wurde ca. 2 cm in transversaler Richtung über dem linken M. temporalis angelegt (Abb. 2.3.).

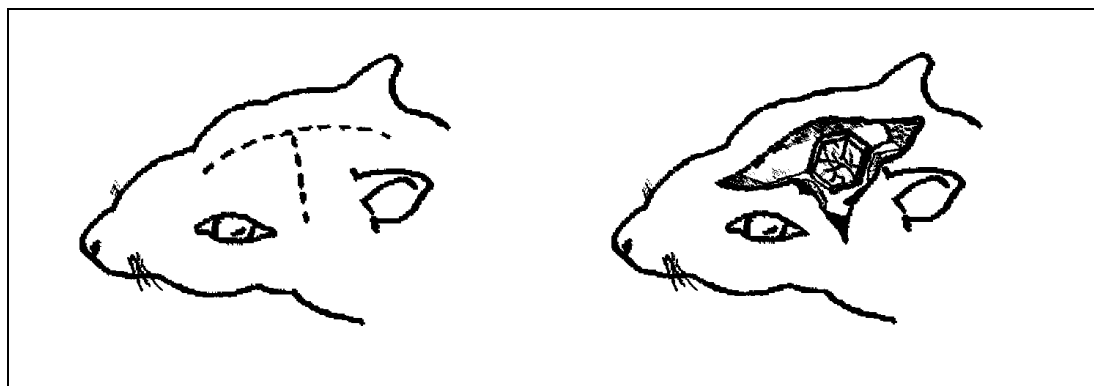


Abb. 2.3.: Chirurgische Präparation des Ratten-Kopfes. Schnittlinienführung zur Eröffnung der Haut durch eine ca. 3 cm lange longitudinale Inzision und einen ca. 2 cm langen, nach links temporal gezogenen Entlastungsschnittes (links). Nach Hautinzision und Resektion des M. temporalis erfolgte eine osteoklastische Trepanation über dem links parieto-temporalen Kortex bei intakter Dura mater (rechts).

Nach Präparation der Kopfhaut, Resektion des M. temporalis und Darstellung des Schädelknochens wurde eine ca. 8 mm große, osteoklastische Trepanation des linken parieto-temporalen Schädels durchgeführt (Abb. 2.3.). Als anatomische Begrenzung dienten die Sagittalnaht, die linke Koronarnaht und Lambdanaht sowie nach temporal der kaudale Ansatz des linken Arcus zygomaticus (Abb. 2.4.). Unter mikroskopischer Kontrolle wurde darauf geachtet, die Dura mater nicht zu beschädigen, um keine Blutung zu verursachen.

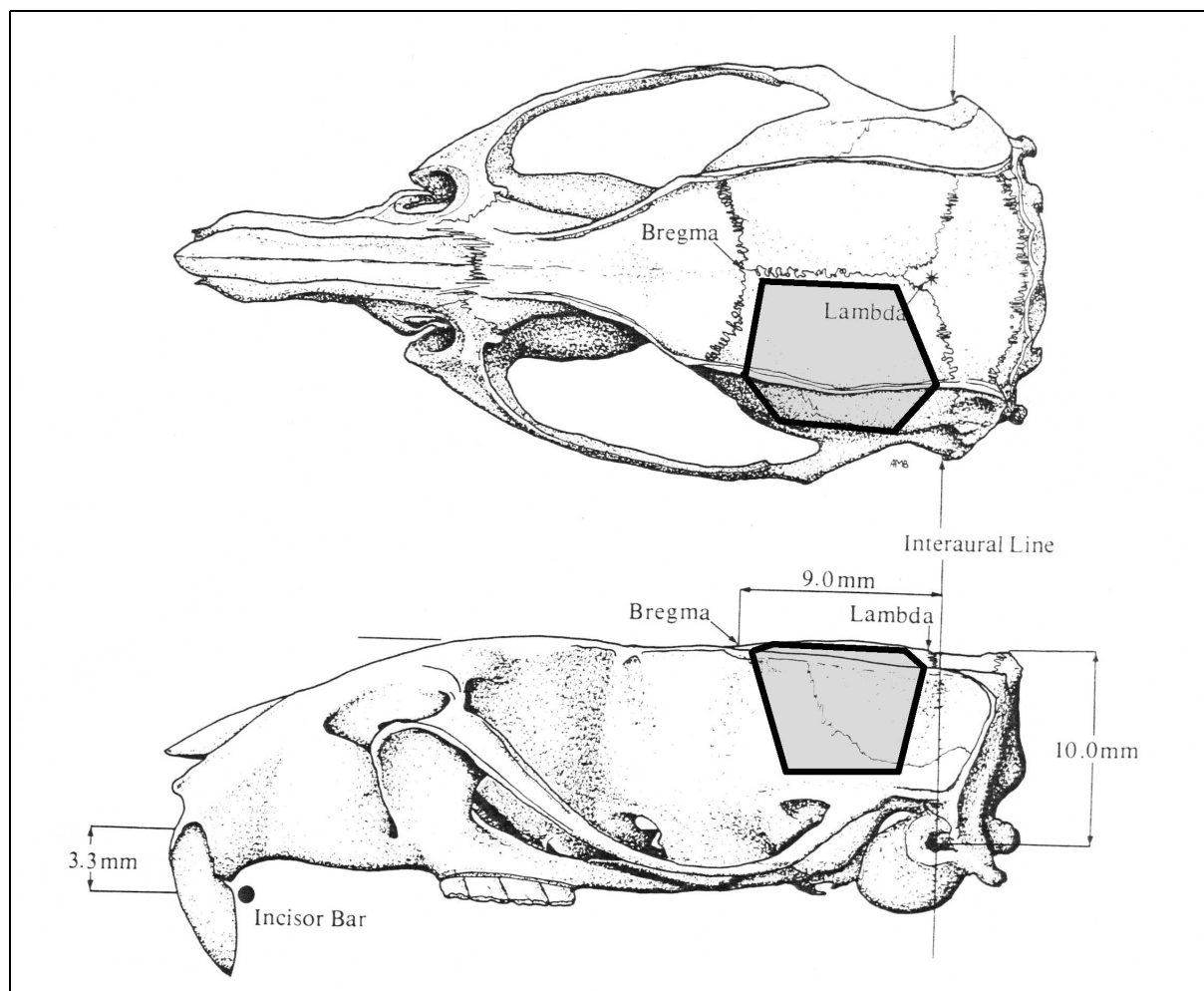


Abb. 2.4.: Rattenschädel mit markierter links parieto-temporaler Trepanation (Paxinos, 1986). Der Knochendeckel mißt ca. 8×8 mm und ist durch die anatomischen Landmarken Sagittal-, Koronar- und Lambdanaht sowie den temporalen Ansatz des Arcus zygomaticus begrenzt.

Die Einstellung des Kontusionstisches und die Richtung des Kontusionsschlittens wurden so gewählt, daß ein zur Kortexoberfläche rechtwinkliges Auftreffen des Kontusionsbolzens in der Mitte der Trepanation gewährleistet war (Abb. 2.5.). Zur Einstellung der Eindringtiefe wurde der Bolzen in maximal ausgefahrener Position mit der Dura mater in Kontakt gebracht. Diese Stellung wurde als "Nullposition" definiert. An dem wieder zurückgefahrenem Schlitten konnte entsprechend der Umdrehungen des Bolzensgewindes die Eindringtiefe des Schlagbolzens genau eingestellt werden. Die Kontusion wurde daraufhin mit einem pneumatischen Druck von 100 psi und einer Eindringtiefe von 2 mm auf die Dura mater appliziert. Abschließend erfolgte die Hautnaht mit 3-0 Prolene Nahtmaterial (Fa. Ethicon, Norderstedt). Die Tiere wurden aus der Halterung entfernt und zurück in die Käfige gesetzt.

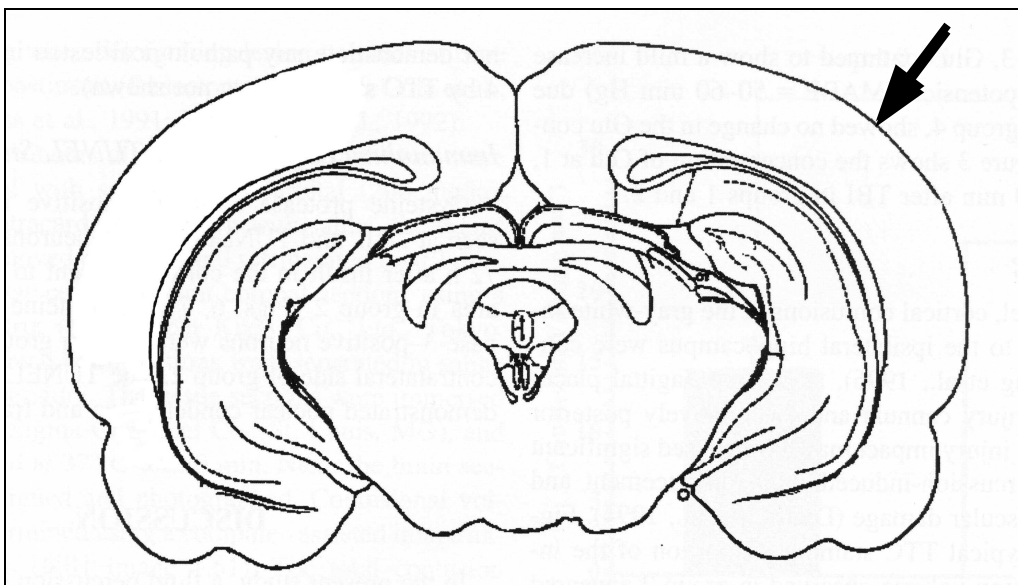


Abb. 2.5.: Richtung des eintreffenden Kontusionsbolzens im rechten Winkel zur Tangente der Kortexoberfläche der linken Hemisphäre.

Alle Tiere wurden 22 Stunden (Std.) nach Trauma neurologisch untersucht (s.u. Kap. 2.4.) und anschließend erneut narkotisiert. Über eine ca. 3 cm lange, nach links lateralisierte, longitudinale Inzision der Bauchdecke wurde die linke Nierenvene aufgesucht und zur Entblutung durchtrennt. Nach Sistieren der Spontanatmung und der Herzaktion wurde die Schädeldecke vollständig entfernt. Nach Abtrennung der Bulbi olfactorii, der Nervi optici und der übrigen Hirnnerven wurde das Gehirn in toto mit Kleinhirn und Medulla oblongata mit einem Spatel entnommen.

## 2.4 Neurologische Untersuchung

Die neurologische Beurteilung erfolgte nach einem neurologischen Score, der ausführlich in Tabelle 2.1. dargestellt ist. Dieser ist eine Kombination aus der von Dixon und Bederson durchgeführten neurologischen Testung nach Trauma mit dem Fluid Percussion-Modell bzw. fokaler Ischämie des Okklusions-Modells der A. cerebri media bei der Ratte (Bederson et al., 1986b; Dixon et al., 1987). Dabei entspricht die Bewertung der Tiere mit einer hohen Punktzahl einer stärkeren Ausprägung des neurologischen Defizits. Die Skala der erreichbaren Punktzahl reicht von 0 bis 23. Die Testung erfolgte unmittelbar vor Hirnentnahme. Die genaue Bewertung der unterschiedlichen Tests ist der Tabelle 2.1. zu entnehmen. Im

folgenden werden die einzelnen Untersuchungen erläutert und sind anhand der Nummerierung in der Tabelle wiederzufinden.

Tab. 2.1.: Beurteilungsskala des neurologischen Defizits

Neurologische Testung	Beurteilungsskala
1. Spontanaktivität:	0 = aktiv, gezielt suchend 1 = aktiv, ungesteuert 2 = reduziert 3 = nicht vorhanden
2. Apnoe-Phasen / Krampfanfälle:	0 = nicht vorhanden 1 = einmalig 2 = zweimalig 3 = häufig
3. Pinna- / Korneal-Reflex:	0 = ja 1 = nein
4. Pfotenflexion:	0 = ja 1 = nein
5. Kopfkontrolle:	0 = sicher 1 = schwach 2 = nicht vorhanden
6. Startle-Reflex:	0 = ja 1 = nein
7. Aufrichten aus Rückenlage:	0 = Tier kann nicht in Rückenlage gebracht werden 1 = richtet sich selbständig wieder auf 2 = Aufrichten nur mit Hilfe möglich 3 = kein Aufrichten möglich
8. Balance:	0 = sicher 1 = unsicher 2 = laufen auf dem Stab nicht möglich 3 = sitzen auf dem Stab nicht möglich
9. Vorderpfoten Extension:	0 = ja 1 = nein
10. seitliche Druckresistenz:	0 = vorhanden 1 = vermindert
11. Zirkulieren:	0 = nein 1 = vorhanden

Zunächst wurde eine allgemeine Bewertung für die Spontanaktivität (1) der Tiere durchgeführt. Das Auftreten von Krampfanfällen und Apnoe-Episoden (2) wurde zusätzlich

vermerkt und beurteilt. Dies wurde über einen Zeitraum von ca. 2 Stunden vor Hirnentnahme erfaßt.

Ferner wurden sechs Tests zur Beurteilung verschiedener Reflexantworten unternommen, mit denen eine Aussage über den Schweregrad des Traumas getroffen werden kann (Dixon et al., 1987). Folgende motorische Reflexe wurden beurteilt: Der Pinna-Reflex (3) ist das Schütteln des Kopfes ausgelöst durch einen sensiblen Reiz am Meatus acusticus externus. Der Korneal-Reflex (3) verursacht den ipsilateralen Lidschlag bei Berührung der Kornea mit einem Wattebausch. Nach Applikation eines Schmerzreizes auf die linke Hinterpfote, wurde die Pfotenflexion (4) bewertet (Collier, 1962). Die Beurteilung der Kopfkontrolle (5), d.h. das Vermögen des Tieres das eigene Gewicht des Kopfes zu tragen, gestattete u.a. eine Aussage über Veränderungen des Muskeltonus. Komplexere Reflexbahnen wurden anhand des Startle-Reflexes (6) getestet, der durch einen kurzen lauten akustischen Reiz (z.B. das Klappen der Klemme eines Schreibbrettes) eine akute, kurzweilige Tonuserhöhung des gesamten Körpers bewirkt. Ebenso wurde die Fähigkeit der Tiere beurteilt, sich aus der Rückenlage spontan wieder aufzurichten (7). Dabei ließ sich im besten Fall das Tier nicht in Rückenlage bringen. Bei starker Beeinträchtigung der Tiere war das selbständige Aufrichten aus der Rückenlage nicht mehr möglich.

Komplexe motorische und vestibuläre Funktionen wurden anhand der Balancierfähigkeit (8) der Tiere beurteilt. Hierbei mussten die Ratten von der Mitte eines 1,5 cm breiten und 1 m langen Holzstabes zu einer Plattform laufen.

Die drei weiteren Untersuchungen zur Bewertung einer Hemiparese wurden ursprünglich für ein Modell der fokalen zerebralen Ischämie bei der Ratte entwickelt (Bederson et al., 1986b). Dafür wurde zum einen die Ratte ca. 30 cm über dem Boden am Schwanz gehalten und auf die reflektorisch auftretende, schützende Extensionshaltung der Vorderpfote geachtet (9). Des Weiteren wurde mit einem Spatel ein Druck im Bereich der linken Schulter ausgeübt, um eine verminderte reflektorische Druckresistenz in der rechten vorderen Extremität beurteilen zu können (sog. "Gegenenhalten", 10). Zuletzt wurden Zirkulationsbewegungen des Tieres in Richtung der paretischen Körperhälfte beobachtet, die je nach Grad der Parese spontan oder bei leichtem Zug am Schwanz auftreten können (11). Bei diesen drei erwähnten Kriterien treten die zuletzt genannten Merkmale stets in Verbindung mit den vorher erwähnten auf.

## 2.5 Quantifizierung von Hemisphärenschwellung und Wassergehalt

Zur Quantifizierung des posttraumatischen Hirnödems wurden bei 10 Tieren der Wassergehalt der Hemisphären sowie die Hemisphärenschwellung bestimmt. Hierfür wurden die Großhirnhemisphären vom Kleinhirn und der Medulla oblongata abgetrennt. Mit Hilfe eines Operationsmikroskops wurden die Trennungsflächen mit einer mikrochirurgischen Schere korrigiert, so daß beide Hemisphären entsprechend ihrer Anatomie symmetrisch waren. Die beiden Hemisphären wurden in der Fissura longitudinalis vorsichtig unter Darstellung des Balkens voneinander gelöst und der Balken in der Mittellinie getrennt. Bei der gesamten Präparation wurde darauf geachtet, daß zügig gearbeitet wurde, um den Wassergehalt nicht durch Eintrocknung des Gewebes zu verfälschen.

Die Hemisphären wurden gewogen und die Feuchtgewichte ( $FG_{li}$ ,  $FG_{re}$ ) bestimmt. Nach Trocknen der Hirnhälften über 24 Stunden bei  $110^{\circ}C$  wurden die Hemisphären erneut gewogen, um damit die Trockengewichte ( $TG_{li}$ ,  $TG_{re}$ ) zu ermitteln. Aus diesen Werten konnten nun Hirnschwellung, Trennfehler und Wassergehalt des Hirngewebes berechnet werden:

Die Hirnschwellung ist der prozentuale Anteil des durch Flüssigkeitseinlagerung entstandenen Mehrgewichts der traumatisierten Hemisphäre im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre:

$$(1) \quad \text{Schwellung (\%)} = [(FG_{li} - FG_{re}) / FG_{re}] \times 100$$

Der Trennfehler als Überprüfung der regelrechten Trennung der Gehirnhemisphären berechnet sich aus den Trockengewichten. Ein Trennfehler unter 3% war die Voraussetzung für die Verwertbarkeit des Schwellungswertes:

$$(2) \quad \text{Trennfehler (\%)} = [(TG_{li} - TG_{re}) / TG_{re}] \times 100$$

Der Wassergehalt beschreibt den prozentualen Flüssigkeitsanteil einer Hemisphäre am gesamten Hemisphärgewicht. Er ist weniger stark von Schwankungen der Hemisphärentrennung abhängig:

$$(3) \quad \text{Wassergehalt (\%)} = [(FGli-TGli)/FGli] \times 100 \text{ bzw. } [(FGre-TGre)/FGre] \times 100$$

## 2.6 Scheinoperationen und Kontrolltiere

Zur Erfassung eines operativ bedingten Hirngewebeschadens wurde eine Gruppe von Tieren (n=5) scheinoperiert. Dafür wurde unter Ketamin/Xylazin-Narkose die V. jugularis externa und die A. femoralis kanüliert. Unter Blutdruckmonitoring wurde die Kopfhaut inzidiert, der M. temporalis reseziert und eine links parieto-temporale Trepanation durchgeführt (s.o. Kap. 2.3.). Dann wurde die Haut mit einer Naht wieder verschlossen und die Tiere wurden wieder in den Käfig gesetzt. Nach 24 Std. wurde das Gehirn nach Entblutung entnommen (s.o. Kap. 2.3.) und zur Quantifizierung von Hirnschwellung und Wassergehalt aufgearbeitet (s.o. Kap. 2.5.).

Eine Gruppe von Kontrolltieren (n=5) diente zur Ermittlung des Wassergehalts bei unbehandelten Tieren. In diesen Fällen wurden die Tiere direkt über die Nierenvene entblutet und deren Hirne wie oben beschrieben (s.o. Kap. 2.3.) entnommen. Anschließend wurde bei den Gehirnen die Hemisphärenschwellung und der Wassergehalt bestimmt (s.o. Kap. 2.5.).

## 2.7 TTC-Färbung

Die Färbung des Hirngewebes mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) wird zur Darstellung des Infarktareals bei Ischämie modellen benutzt (Bederson et al., 1986a; Isayama et al., 1991). TTC agiert als Protonenakzeptor für viele mitochondriale Enzymsysteme, wie z.B. Dehydrogenasen. Sie sind von einem minimalem Metabolismus abhängig und dienen der Bereitstellung zellulärer Energiereserven durch Phosphorylierung von Adenosindiphosphat zu Adenosintriphosphat. Das wasserlösliche Salz TTC ist nicht als Farbe wirksam, sondern wird von diesen Enzymen durch Reduktion zu rotem, lipidlöslichen und lichtempfindlichen Formazan umgewandelt. Im Rahmen einer Ischämie oder eines Traumas kommt es aufgrund eines Energiedefizits zu einer Dysfunktion der mitochondrialen Enzymsysteme, so daß in diesen Arealen die erwartete Rotfärbung ausbleibt. Damit färbt TTC ungeschädigtes

Hirngewebe rot und grenzt es deutlich von geschädigtem ungefärbtem Gewebe ab (Liszczyk et al., 1984).

Bei 10 Tieren wurde das entnommene Gehirn 15 min in einer Kühltruhe bei -30°C gefroren und daraufhin in sieben Scheiben mit einer Dicke von je 2 mm geschnitten. Diese wurden jeweils in eine 2%ige Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung (Fa. Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA) in 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4; Apotheke der Charité, Campus Virchow Klinikum, Berlin) für 30 Min. bei 37°C lichtgeschützt inkubiert. Hiernach zeigte sich eine Rotfärbung des ungeschädigten Gewebeanteils. Das geschädigte Gewebe stellte sich als weißes, nicht gefärbtes Areal dar. Die Schnitte wurden daraufhin bezüglich Abstand, Vergrößerung und Belichtungszeit standardisiert von beiden Seiten fotografiert. Die entwickelten Aufnahmen wurden mit einem Scanner (Sharp Jx 330, Fa. Sharp Cooperation, Japan) digitalisiert. Mit der Software SigmaScan for Windows (Fa. Jandel Scientific, Erkrath, Deutschland) konnten die nichtgefärbten Areale computergestützt in ihrer Flächengröße vermessen werden. Das Kontusionsvolumen eines Schnittes wurde berechnet, indem der Mittelwert der gemessenen Fläche von Vorder- und Rückseite des Schnittes mit der Dicke von 2 mm multipliziert wurde. Das gesamte Kontusionsvolumen des Gehirns ergab sich aus der Addition der Kontusionsvolumina aller Schnitte.

## 2.8 Extravasation von Evans Blue

Bei intravenöser Gabe des Farbstoffs Evans Blue erfolgt dessen Bindung an Serumalbumin. Nur bei geschädigter Blut-Hirn-Schranke tritt dieser Komplex in das Hirngewebe über und markiert somit Areale gestörter Gefäßpermeabilität. Zur Quantifizierung des vasogenen Hirnödems wurden fotometrische Messungen des Farbstoffs aus dem Gewebe vorgenommen (Ikeda et al., 1994; Roessner und Tempel, 1966; Smith et al., 1994). Die morphologische Beurteilung der Extravasation von Evans Blue (s.u. Kap. 2.9.3.) erfolgte durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von histologischen Schnitten (Saria und Lundberg, 1983; Sasaki et al., 1978).

In den Katheter der Vena jugularis wurde bei 10 Tieren 23 ½ Stunden nach Trauma eine steril filtrierte 2%ige Evans Blue Lösung (Fa. Merck, Darmstadt) in einer Menge von 2 ml/kg Körpergewicht langsam injiziert. Nach der 30-minütigen Zirkulation des Farbstoffs wurde der



Thorax eröffnet und mit einer Kanüle die linke Herzkammer punktiert. Zum Auswaschen des Farbstoffs aus dem Intravasalraum wurde nach Inzision der Nierenvene das Tier kardial mit einem Volumen von 80 ml physiologischer NaCl-Lösung perfundiert und gleichzeitig entblutet. Die Hirnentnahme erfolgte daraufhin wie beschrieben (s.o. Kap. 2.3.).

### *2.8.1 Fotometrische Quantifizierung*

Bei 6 der Evans Blue (EB) perfundierten Tiere erfolgte nach Hirnentnahme die Abtrennung des Kleinhirns und der Medulla oblongata von den Großhirnhemisphären. Die Hemisphären wurden unter mikroskopischer Kontrolle in der Mittellinie voneinander getrennt. Es wurden die Feuchtgewichte der Hemisphären bestimmt. Die traumatisierte Hemisphäre wurde zur besseren Exposition des intraparenchymalen Evans Blue im Mittelpunkt der Kontusion horizontal und vertikal durchgeschnitten. Ebenso wurde mit der kontralateralen Hemisphäre verfahren. Die Gewebeanteile wurden entsprechend der Hemisphärenzugehörigkeit in zwei Reagenzgläser gegeben und je ein Volumen von 2 ml Formamid (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim) hinzugefügt. Der Farbstoff Evans Blue konnte vom Gewebe über 72 h bei Raumtemperatur in die Formamid-Lösung gehen. Daraufhin wurden die Hemisphären entnommen, für 24 Stunden bei 110°C getrocknet und anschließend deren Trockengewichte bestimmt.

Die Formamid-Lösung wurde 10 Min. bei 3000 U/min zentrifugiert und 5 ml abpipettiert. Zur spektralfotometrischen Konzentrationsbestimmung von Evans Blue wurde eine Standardkurve ermittelt, indem bei sechs Proben mit bekannten aufsteigenden Konzentrationen von Evans Blue in Formamid die Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 625 nm gemessen wurde (Beckman DU 640, Beckman Instr. Co., Fullerton, CA). Mit Hilfe dieser Standardkurve konnte nach spektralfotometrischer Messung der Lichtabsorption aus den Versuchsproben die Konzentration von Evans Blue bestimmt werden ( $\mu\text{g EB/ml}$  bzw.  $\mu\text{g EB/Hemisphäre}$ ). Durch die Bestimmung der Trockengewichte der Gehirne wurde die Menge Evans Blue bezogen auf die Gewebemasse ( $\text{ng EB/mg TG}$ ) umgerechnet.

## 2.9 Histologie

Zur morphologischen Charakterisierung des posttraumatischen Hirnschadens wurde eine histologische Aufarbeitung der Hirnpräparate durchgeführt. Für die Hämatoxylin-Eosin und die Silberimprägnations-Färbung (Bielschowsky-Färbung) wurden die Präparate der 2 mm dicken Hirnschnitte der TTC-Färbung für 14 Tage in 5%iger Formaldehyd-Lösung (Fa. Baker, Deventer, Holland) eingelegt und dadurch entfärbt. Daraufhin wurden sie gewässert und anschließend über eine aufsteigende Alkoholreihe in Äthylalkohol (Fa. Herbeta, Berlin) für 48 Stunden entwässert, in Paraffin (Fa. Sherwood Medical Co, St. Louis, MO, USA) eingebettet und bei 4°C für 24 Stunden ausgehärtet. Mit einem Schlittenmikrotom (Fa. Leica, Bensheim) wurden aus den Paraffinblöcken in unterschiedlicher Dicke koronare Schnitte angefertigt.

### 2.9.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Schnitte wurden mit einer Schnittdicke von 7 µm angefertigt, auf einen Objektträger (SuperFrostPlus, Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgebracht und bei 37°C über 24 Std. getrocknet. Die Präparate wurden in Xylol und Äthylalkohol (Fa. Merck, Darmstadt) entparaffiniert. In einer gebrauchsfertigen Mayers Hämalaunlösung (Fa: Chroma-Gesellschaft, Schmid AG, Köngen) wurden die Schnitte für 5 Minuten angefärbt (Kernfärbung). Daraufhin wurden die Objektträger zunächst in Aqua destillata (Fa. Braun, Melsungen), dann in 1%iger HCl-Alkohol Lösung (Fa. Merck, Darmstadt) und abschließend dreimalig unter Leitungswasser für insgesamt 5 Minuten gespült. Es folgte das Färben in 0,5%iger Eosin-Lösung für 8 Minuten. Die Schnitte wurden in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 95%, 100% Äthanol), in einem Äthanol-Xylol-Gemisch (1:1) und schließlich in Xylol für jeweils 5 Minuten eingestellt. Zuletzt wurden die Schnitte mit einem wasserfreien Eindeckmittel fixiert und eingedeckt.

### 2.9.2 Bielschowsky-Färbung

Hierfür wurden 20 µm dicke Schnitte angefertigt und auf einen Objektträger (Dako ChemMate, Dako A/S, Fa. Bio Tek Solutions, USA) gebracht und bei 37°C über 24 Std.

getrocknet. Die Schnitte wurden entparaffiniert und in Aqua destillata getaucht. Danach wurden sie in ein Bad mit 20%iger Silbernitratlösung (Fa. Merck, Darmstadt) für 30 Minuten bei 37-40°C gestellt. Die Schnitte sollten sich makroskopisch hellbraun anfärben. Sie wurden erneut in Aqua destillata kurz abgespült. Es wurde eine ammoniakalische Silbernitratlösung erstellt, indem zu der Silbernitratlösung solange 25%iger Ammoniak (Fa. Merck, Darmstadt) titriert wurde, bis sich kurz nach einem zunächst entstandenen schwärzlichen Niederschlag eine klare Lösung ergab. Hierin wurden die Präparate für 30 Minuten bei 37-40°C inkubiert. Sie wurden daraufhin mit 5%igem Ammoniak und Aqua destillata gespült. Erneut wurden sie in 50 ml ammoniakalische Silbernitratlösung für 2-3 Minuten eingelegt, in die zwei Tropfen Entwickler hinzugegeben wurden (Entwickler: 20 ml 37%iges Formaldehyd, 0,5 ml Zitronensäure, 1 Tropfen 65%iger Salpetersäure in 100 ml Aqua destillata, Fa. Merck, Darmstadt). Es folgte erneut die Spülung in 5%igem Ammoniak und Aqua destillata. Die Präparate wurden in 5%iger Natriumthiosulfatlösung (Fa. Merck, Darmstadt) für 2-3 Minuten fixiert, in Leitungswasser 5 Minuten gespült, entwässert und eingedeckt. In der Bielschowsky-Versilberung lassen sich die axonalen Strukturen beurteilen.

### 2.9.3 *Fluoreszenzmikroskopie*

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden vier mit Evans Blue perfundierte Gehirne für 48 h in eine 2%ige Sucrose-Formalin Lösung (Fa. Merck, Darmstadt) eingelegt und daraufhin in einer Kühltruhe bei -80°C gefroren. In einem Cryostat (Mikrom HM 500 OM; Fa. Mikrom GmbH, Walldorf) wurden 10 µm dicke koronare Schnitte von frontal bis kaudal durch das ganze Gehirn angefertigt. Jeder 50. Schnitt wurde für die Fluoreszenzmikroskopie herangezogen. Sie wurden auf einem Objektträger (Dako ChemMate, Dako A/S, Fa. Bio Tek Solutions, USA) aufgebracht und direkt mit einer Wellenlänge von 500 bis 540 nm in einem Durchlicht-Mikroskop (Leica DMRB; Fa. Leica Wetzlar) betrachtet und fotografiert (Film: Kodak Ektachrome P1600x Professional). Evans Blue hat bei dieser Wellenlänge fluoreszierende Eigenschaften. Die fluoreszierenden Gewebeanteile entsprechen der morphologischen Verteilung von Evans Blue im Extravasalraum. Dadurch kann dessen Ausdehnung und die zelluläre Anreicherung beurteilt werden.

## 2.10 Therapiestudie mit dem 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonisten Bay X 3702

Die in den Kapiteln 2.1. bis 2.9. beschriebenen Untersuchungen dienen der Evaluation des Controlled Cortical Impact Injury auf dessen Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit sowie zur Charakterisierung des posttraumatischen Hirnschadens. In den folgenden Versuchen wurde eine Therapiestudie durchgeführt, um die Wirkung einer potentiell neuroprotektiven Substanz auf den posttraumatischen Hirnschaden nach CCII zu untersuchen. Dafür wurde die Substanz Bay X 3702, ein 5-Hydroxytryptamin(HT)<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonist verwendet. In Modellen der zerebralen Ischämie bei der Ratte hatte diese Substanz eine Verringerung des postischämischen Schaden bei der Ratte bewirkt (Bielenberg und Burkhardt, 1990; Bode-Greuel et al., 1990).

### 2.10.1 Substanz (Bay X 3702) und Placebo

Die verwendete Substanz Bay X 3702 (Bayer AG, Wuppertal; Tropon Werke, Köln) ist eine weiße, geruchlose und wasserlösliche 2-Aminomethyl-Chroman Verbindung, die agonistische Eigenschaften am 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptor, einem Serotonin-Rezeptor-Subtyp, besitzt. 0,1 mg der lyophilisierten Substanz Bay X 3702 wurden zusammen mit einem Trägermedium von 70 mg Mannitol und 1,9 mg Zitronensäure zur Verfügung gestellt. Sie wurde vor den Versuchen lichtgeschützt und gekühlt bei 4°C gelagert. Die Substanz wurde am Tag der Versuche mit 20 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst und nur am selben Tag verwendet. Als Placebo wurde allein das Trägermedium verwendet. Es wurde ebenfalls am Versuchstag frisch in gleicher Konzentration mit physiologischer NaCl-Lösung gelöst. Das Injektionsvolumen pro Substanz- bzw. Placeboapplikation war 2 ml/kg KG. Bay X 3702 wurde dabei in einer Dosierung von 0,01mg/kg KG verabreicht.

### 2.10.2 Versuchsdurchführung

Als Versuchstiere wurden männliche Sprague Dawley Ratten (n = 43; Fa. Charles River Deutschland, Sulzfeld) mit einem Gewicht von 250-350 g verwendet.

Die Narkoseeinleitung erfolgte über 3 Minuten in einem 5%igen Isofluran-Gemisch mit  $\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$  (2:1) in einer gasdurchströmten Kammer. Während der Präparation der Tiere wurde die Narkose mit 2%igem Isofluran-Gemisch bei den spontan atmenden Tieren über eine Maske aufrechterhalten. Die rektal gemessene Körpertemperatur wurde die gesamte Operationszeit mit einer regulierbaren Heizmatte zwischen 37 und 38 °C gehalten.

Bei allen Tieren wurde der Schädel links parieto-temporal freigelegt. Im Bereich von Bregma bis Lambda innerhalb der Knochennähte bis temporal zum kaudalen Ansatz des Arcus zygomaticus wurde linksseitig eine osteoklastische Trepanation durchgeführt (s.o. Kap. 2.3.). Es wurden am rechten Hinterlauf die Vena und Arteria femoralis freipräpariert und kanüliert. Der venöse Zugang diente der Substanzapplikation. An der Arterie wurden der Blutdruck während des Traumas und der Substanzgabe überwacht und es konnte arterielles Blut zur Blutgasanalyse entnommen werden. Die Applikation des Traumas erfolgte mit einer konstanten Eindringtiefe von 2 mm und einem pneumatischen Druck von 100 psi.

Allen Tieren wurde bei der Substanz- bzw. Placeboapplikation ein Volumen von 2 ml/kg KG in drei Injektionen langsam über je 3 Minuten i.v. injiziert. Die Injektionen erfolgten direkt, 2 Stunden und 4 Stunden nach dem Trauma. Direkt vor Traumaapplikation sowie 15 Minuten danach wurden arterielle Blutgasanalysen ( $\text{aPO}_2$ ,  $\text{aPCO}_2$  und pH [ $n_{\text{Verum}} = 9$ ;  $n_{\text{Placebo}} = 9$ ]) bestimmt.

Zur Kontusionsvolumenbestimmung wurden zwei Gruppen gebildet. Bei 10 Tieren wurden durch i.v.-Injektionen 0,01 mg/kg KG der gelösten Substanz (Bay X 3702) appliziert. In der Kontrollgruppe ( $n=10$ ) wurde das gelöste Trägermedium allein als Placebo gegeben. Der Blutdruck wurde bei beiden Gruppen [ $n_{\text{Verum}} = 10$ ;  $n_{\text{Placebo}} = 10$ ] über 30 Minuten nach Trauma aufgezeichnet. Hiernach wurde die Narkose unter Sauerstoffbeatmung ausgeleitet, bis die wachen Tiere zurück in den Käfig gesetzt werden konnten.

Zur Quantifizierung des Kontusionsvolumens wurden die Tiere nach 24 Stunden in Narkose entblutet, und das Gehirn nach Abtrennung der Medulla oblongata sowie der Bulbi olfactorii entnommen (s.o. Kap. 2.3.). Die Gehirne wurden in N-Methyl-Butan (Fa. Merck, Darmstadt) bei -50°C schockgefroren und mit einem Kryostat im Bereich der gesamten Kontusion in koronare Schnitte mit einer Schnittdicke von 20  $\mu\text{m}$  im Abstand von 200  $\mu\text{m}$  geschnitten. Danach wurden sie auf einem Objektträger fixiert und mit Kresyl-Violett (Nisslfärbung) eingefärbt. Somit war die Differenzierung zwischen schwach gefärbtem kontusionierten und

violett gefärbtem nichtgeschädigten Gewebe als Voraussetzung für die morphometrische Quantifizierung des Kontusionsvolumen möglich. Hierfür wurde eine computergestützte Videoeinheit und die Software Bioscan Optimas Vers. 5.0 (Fa. Stemmer PC-Systeme GmbH, Puchheim) eingesetzt. Unter Berücksichtigung der Schnittdicke konnte für das gesamte Gehirn das Kontusionsvolumen berechnet werden (s.o. Kap. 2.7.).

Bei 20 Tieren wurden das posttraumatische Hirnödem quantifiziert. Dafür wurden bei der Placebogruppe (n=10) und der Verumgruppe (n=10) ebenfalls der Blutdruck über 30 Minuten erfaßt. Nach 24 Stunden wurden die Tiere entblutet und die Gehirne wie oben beschrieben entnommen. Das Zerebellum und der Hirnstamm wurden abgetrennt. Die Schnittstellen zum Hirnstamm, den Nn. optici und den Bulbi olfactorii wurden unter mikroskopischer Kontrolle auf anatomische Symmetrie nachbearbeitet. Die Hemisphären wurden getrennt und zur Bestimmung der Feuchtgewichte ( $FG_{li}$ ,  $FG_{re}$ ) separat gewogen. Sie wurden über 24 Stunden bei 110°C getrocknet, um die Trockengewichte ( $TG_{li}$ ,  $TG_{re}$ ) zu ermitteln (s.o. Kap. 2.6.).

In einer weiteren Untersuchung wurden drei Tiere über 4½ Stunden in Narkose gehalten, um das Blutdruckverhalten der Tiere nach Trauma und dreifacher Substanzapplikation zu untersuchen. Es wurde der arterielle Blutdruck über den gesamten Zeitraum der drei Injektionen mit 0,01 mg/kg KG Bay X 3702 von einem Computersystem mit einer in LabView for Windows speziell entwickelten Oberfläche erfaßt (Multi Modal Monitoring Software; Autor: T. Bardt, 1995).

## 2.11 Statistische Methoden

In allen Tabellen und Graphiken sind arithmetische Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (SEM) bzw. die Standardabweichung (STD) angegeben. Der Überprüfung der Signifikanzen zweier Mittelwerte wurde eine Prüfung auf Normalverteilung vorangestellt und daraufhin die Auswahl des statistischen Tests getroffen. Zur Ausführung der Testverfahren diente die Software Sigma Stat für Windows Vers. 3.0 (Fa. Jandel Scientific Deutschland, Erkrath). Die verwendeten Testverfahren sind entsprechend angegeben. Die Analyse der gegenseitigen Abhängigkeit zweier Parameter erfolgte durch die Berechnung der Regressionsfunktion. Die Regressionsgerade zur Schätzung von y aus x wurde unter der Bedingung der minimalen Streuung der y-Werte durch Ermittlung der Summe der kleinsten

Abweichungsquadrate durchgeführt. Die Berechnung von Mittelwerten, SEM, STD, Regressionsgerade, Maßkorrelationskoeffizienten  $r$  und Signifikanzniveau  $p$  wurde mit Hilfe der Software Sigma Plot für Windows Vers 3.0 (Fa. Jandel Scientific Deutschland, Erkrath) durchgeführt.

## 3

## ERGEBNISSE

## 3.1 Kinetik des Bolzenschlages

Durch die analoge Datenerfassung wurde während des Bolzenschlages die veränderte Position des Bolzens in einer Frequenz von 4 Meßdaten/ms aufgezeichnet. Es wurden mehrere Versuchsdurchläufe der reinen Abwärtsbewegung [ $n=10$ ] durchgeführt. Die in Abb. 3.1.1. dargestellte Kurve zeigt die reine Abwärtsbewegung des Bolzens. Da die Meßsonde die Position des oberen Endes der Kontusionsstange im mittleren Bereich der zurückgelegten Strecke erfaßt, ergibt sich durch den zuführenden und den wegführenden Bewegungsverlauf eine Kurve mit abfallendem Kurvenverlauf, einem Wendepunkt und darauf folgenden Steigung der Kurve. Der Betrag der errechneten Steigung kann als Geschwindigkeit herangezogen werden und ist in Abb. 3.1.2. dargestellt. Dabei wird der Bereich des Kurvenwendepunktes (grau unterlegt) als Artefakt ignoriert (Unterbrechung des Graphen). Die Abwärtsbewegung des Bolzens wird innerhalb von 57 Meßwerten erfaßt, was einer gesamten Bewegungsdauer von 19 ms entspricht. Es zeigt sich eine fortlaufende Beschleunigung bis zum Abbruch der Bewegung durch einen mechanischen Widerstand. Die Geschwindigkeit wird durch das Eindringen des Bolzens in das Gehirngewebe nicht meßbar verändert. In Abb. 3.1.2. wird die gleichmäßige Zunahme der Geschwindigkeit durch einen abrupten Abfall mit kurzzeitig negativen Geschwindigkeitswerten dargestellt. Der Abfall entspricht dem plötzlichen Abbruch der Bewegung und die negativen Werte einer elastischen Rückwärtsbewegung des Bolzens. Die Höchstgeschwindigkeit am Kurvengipfel betrug 7,69 m/s. Die gemessene Kontaktzeit des Bolzens mit der Hirnoberfläche lag bei  $318,6 \pm 3,4$  ms.



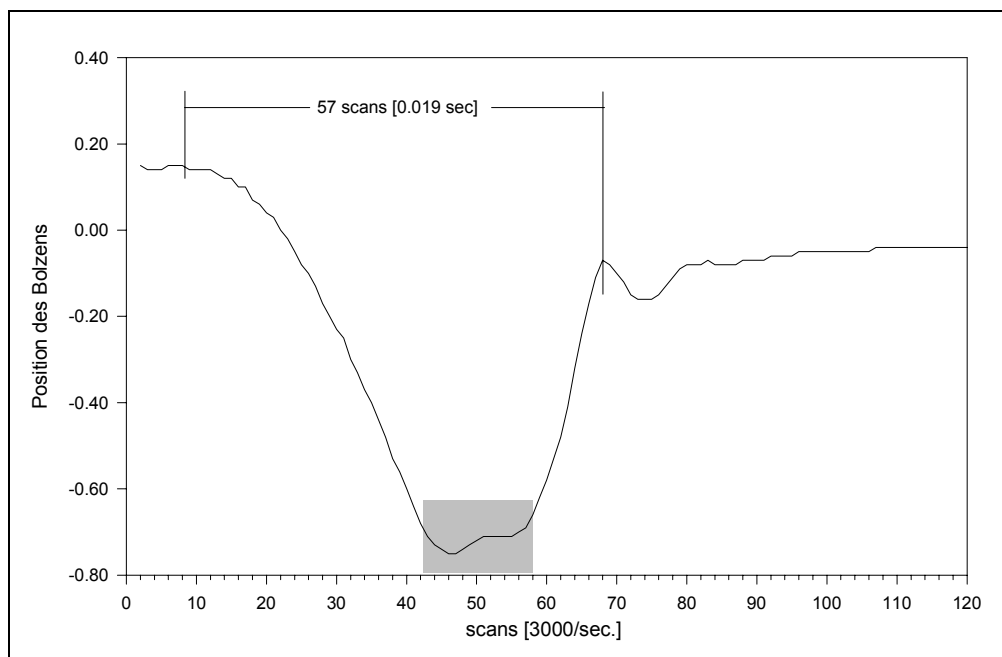


Abb. 3.1.1.: Bewegung des Bolzenschlages aufgezeichnet durch die Velocity Data Acquisition Software. Gezeigt ist die Datenerfassung während der Abwärtsbewegung des Bolzens. Auf der x-Achse sind die einzelnen Meßwerte aufgetragen, die mit einer Erfassungsrate von 3000/s aufgezeichnet wurden. Die y-Achse zeigt die Position des Bolzens. Die gesamte Abwärtsbewegung hatte eine Gesamtdauer von 19 ms. Der Wendepunkt der Kurve (grau unterlegt) ist durch den in der Mitte der zurückgelegten Strecke gelegenen Datensensor zu erklären. Der Betrag der Steigung der Kurve entspricht der Geschwindigkeit des Bolzens.

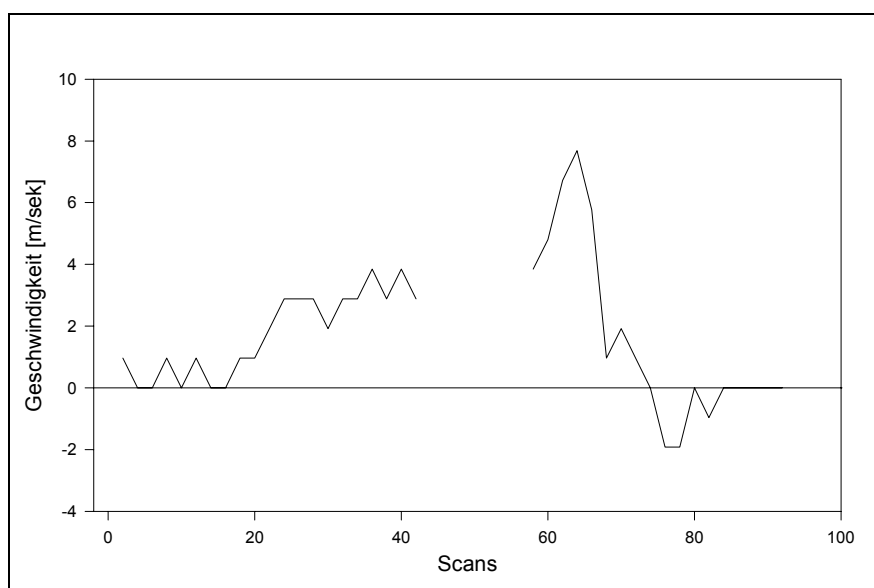


Abb. 3.1.2.: Geschwindigkeit des Bolzenschlages aus dem Betrag der Steigung des Graphen 3.1.1. berechnet. Auf der x-Achse sind die Meßwerte, auf der y-Achse die Geschwindigkeit in m/s dargestellt. Es zeigte sich eine langsam kontinuierliche Beschleunigung des Bolzens mit ansteigender Geschwindigkeit auf einen Maximalwert von 7,69 m/s zum Zeitpunkt des Einschlages. Der unterbrochene Kurvenverlauf ist durch den in der Berechnung vernachlässigten Wendepunkt der Kurve zu erklären. Die negativen Werte am Kurvenabschluß beschreiben eine kurzzeitige elastische Rückholbewegung nach Abbremsung des Bolzens.

## 3.2 Posttraumatische Untersuchungen in vivo

### 3.2.1 Mittlerer arterieller Blutdruck

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAD) fällt direkt nach Trauma um 4,3% ab (Abb. 3.2.). Der Tiefpunkt nach 120 Sekunden ist gegenüber dem Anfangswert nicht signifikant verringert. Alle Werte liegen im Mittel zwischen 75-85 mmHg.

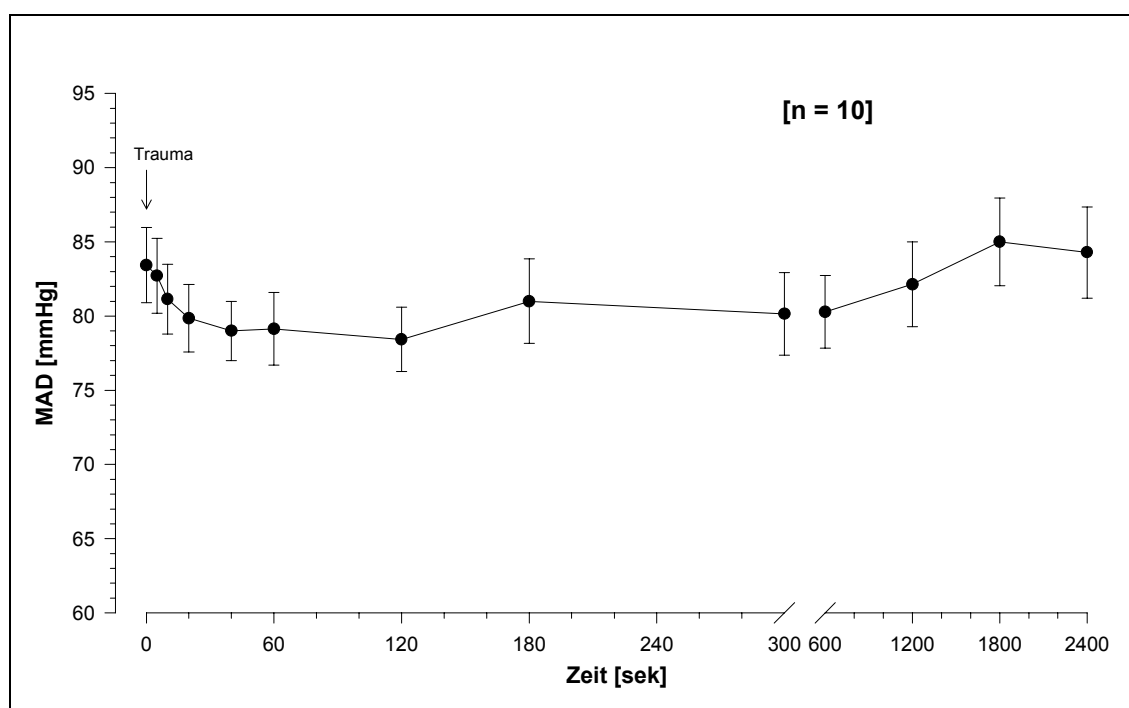


Abb. 3.2.: Reaktion des mittleren arteriellen Blutdruck (MAD) in mmHg über die Zeit von 30 Minuten nach Trauma bei 10 Tieren. Die Abweichung ist als mittlerer Standardfehler der Mittelwerte angegeben (SEM). Es zeigte sich ein vorübergehender nicht-signifikanter Abfall des MAD nach Trauma (ANOVA).

### 3.2.2 Arterielle Blutgasanalyse

Die Werte  $aPO_2$ ,  $aPCO_2$  und pH unter Xylazin/Ketamin-Narkose sind in Tabelle 3.1. dargestellt. Es zeigen sich nach Trauma keine signifikanten Veränderungen der Meßparameter. Der posttraumatisch beobachtete Anstieg der Atemfrequenz bewirkt keine signifikante Veränderung der Werte.

Tab. 3.1.: arterielle Blutgase vor und nach Trauma (Abweichung als SEM).

aPO2 [mmHg]		aPCO2 [mmHg]		pH	
vor	nach	vor	nach	vor	nach
76,6 ± 3,2	79,8 ± 4,7	41,8 ± 0,6	39,4 ± 1,2	7,358 ± 0,02	7,362 ± 0,05

### 3.2.3 Neurologische Untersuchung

Bei einer Gesamtzahl von 29 neurologisch getesteten Tieren starben unmittelbar nach Trauma oder innerhalb der ersten 24 Stunden 3 Tiere. Daraus ergibt sich eine Mortalität von 9,7% während der Vorversuche. Die neurologische Untersuchung der Tiere ergibt entsprechend der neurologischen Beurteilungsskala aus Tabelle 2.1. einen durchschnittlichen Wert von 2,56. Die Verteilung der Bewertung aller Tiere sowie der Mittelwert mit Standardabweichung ist in Abbildung 3.3. zu sehen. Kein Tier erreicht einen höheren Wert als 5, und bei einem Tier ist kein neurologisches Defizit festzustellen.

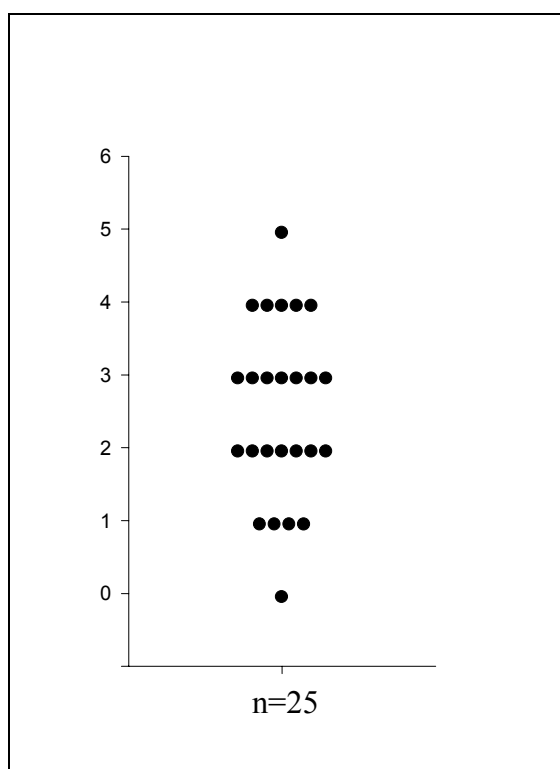


Abb. 3.3.: Neurologische Bewertung entsprechend der beschriebenen neurologischen Beurteilungsskala (siehe Kap. 2.4.). Dabei entspricht die Bewertung mit 0 einem neurologisch unauffälligen Tier und ein hoher Punktwert einem hohen neurologischen Defizit. Die gesamte Skala reicht von 0-23. Das Diagramm zeigt mit Einzelpunkten die Beurteilung von 25 Tieren. Kein Tier erhielt eine schlechtere Bewertung als 5. Bei einem Tier war kein neurologisches Defizit erfassbar. Der durchschnittliche Wert aller Tiere ergab 2,56.

Die Verteilung des posttraumatischen neurologischen Defizits in den einzelnen Untersuchungen ist in Abbildung 3.4. dargestellt. Die Anzahl der Tiere sind auf der x-Achse, die einzelnen Untersuchungen auf der y-Achse wiedergegeben. Am häufigsten wurden bei der posttraumatischen Untersuchung Einschränkungen der Spontanbewegung und der Fähigkeit, auf einem Stab balancieren zu können, beobachtet. In beiden Tests waren 19 Tiere betroffen. Eine reflektorische Reaktion auf einen lauten akustischen Stimulus (Startle-Reflex) war bei acht Tieren nach Trauma nicht mehr zu beobachten. In den weiteren Untersuchungen ergaben sich nur in wenigen Tieren Befunde für ein neurologisches Defizit. Apnoe-Phasen wurden nur bei einem Tier beobachtet. Krampfanfälle wurden bei einem Tier gesehen, wobei ein zweites Tier die 24 Stunden nicht überlebte. Pinna- und Korneal-Reflex, die Beurteilung der Kopfkontrolle und die adäquate Reaktion auf einen Schmerzreiz in der unteren Extremität waren durch das Trauma kaum eingeschränkt. Bei der Untersuchung einer Halbseitenschwäche wurde der Abstützversuch bei drei Tieren als positiv bewertet. Eine verminderte Seitendruckresistenz zeigte sich bei einem Tier, während ein zirkulierendes Gangbild nicht beobachtet wurde.

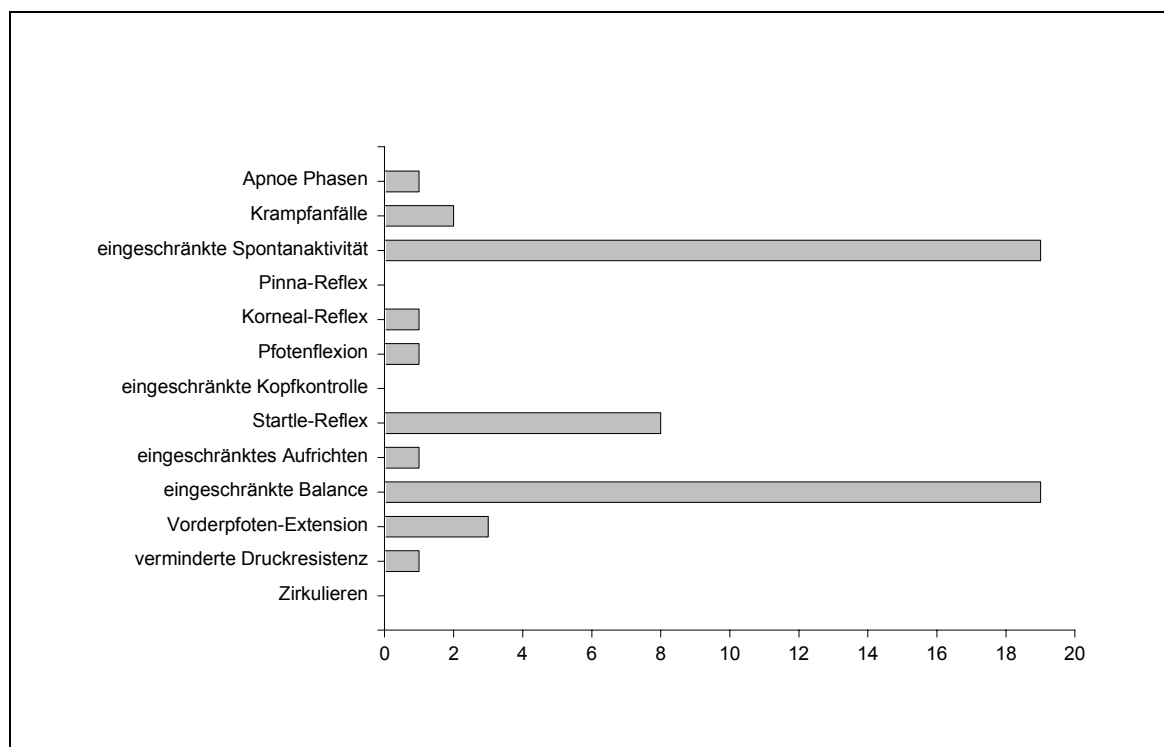


Abb. 3.4.: Verteilung der positiven neurologischen Untersuchungsergebnisse bei 25 Tieren. Die Spontanbewegung sowie das Vermögen der Tiere, auf einem Stab zu balancieren, waren am häufigsten nach Trauma beeinträchtigt.

### 3.3 Posttraumatische Veränderungen des Hirngewebes

#### 3.3.1 *Makroskopische Beschreibung des Traumas*

Während der Hirnentnahme konnte bei allen Tieren im Bereich der Trepanation eine schmale Einblutung unterhalb der Dura beobachtet werden. Die Dura war bei allen Tieren intakt. Nach gewebeschonender Freilegung des Gehirns durch Abtrennung der Schädeldecke und der harten Hirnhäute konnte das subdurale Hämatom leicht mit einem Tupfer als Koagel von der Hirnoberfläche entfernt werden. Es zeigte sich unterhalb des Koagels eine blutig imbibierte Hirnoberfläche mit sowohl flächigen als auch kleinen punktförmigen Einblutungen (Abb. 3.5.). Die Ausdehnung des oberflächlichen Hämatoms wurde in longitudinaler und koronarer Richtung bestimmt. Es ergab sich eine durchschnittliche Ausbreitung des Hämatoms auf der Fläche von  $74,87 \pm 0,08 \text{ mm}^2$ . In den für die TTC-Färbung angefertigten Schnitten zeigten sich stets auch Blutungen in tieferen Schichten des Hirngewebes. Diese demarkierten oft makroskopisch das kontusionierte Areal im nicht gefärbten Hirnschnitt. Das Hirngewebe selbst war sowohl durch die Blutung als auch durch die Gewebeschwellung in seiner Struktur verändert. Bei allen Tieren zeigte sich eine kortikalen Schwellung, die gelegentlich auch zur Mittellinienverlagerung führte. Es wurden keine durch das Trauma verursachten offenen Zerreissungen der kortikalen Oberfläche anhand der makroskopischen Betrachtung beobachtet.

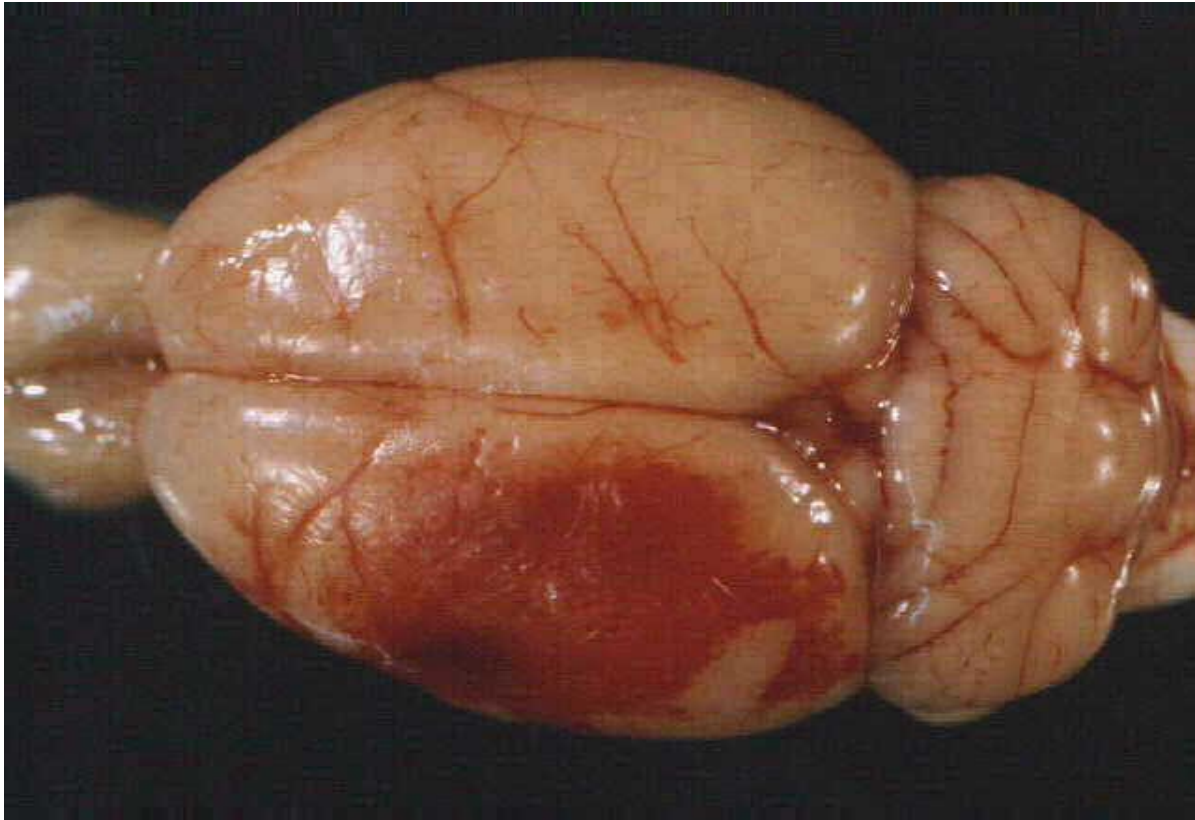


Abb. 3.5.: Aufsicht auf ein traumatisiertes Rattengehirn nach Hirnentnahme. Links parieto-temporale Kontusion mit fokal begrenzter kortikaler Einblutung im Bereich des Kontusionsherdes. Am linken Bildrand sind die Frontalpole mit den Bulbi olfactorii zu erkennen. Rechts zeigt sich das Kleinhirn sowie der proximale Anteil der Medulla oblongata.

### 3.3.2 Hemisphärenschwellung und Wassergehalt

Die posttraumatische Hemisphärenschwellung und der Wassergehalt quantifizieren das posttraumatische Hirnödem. Die Schwellung der traumatisierten linken Hemisphäre betrug  $14,3 \pm 1,21\%$ . Der Trennfehler in dieser Serie war  $1,5 \pm 0,2\%$  (Abb. 3.6.).

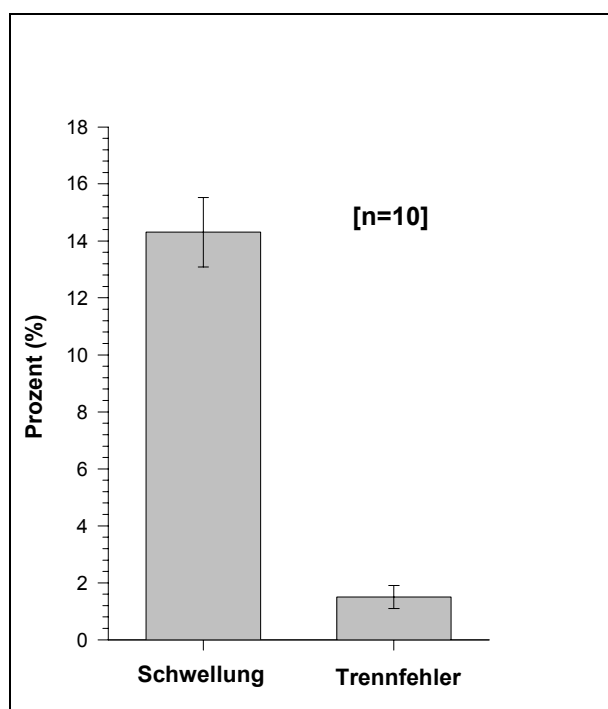


Abb. 3.6.: Posttraumatische Hemisphärenschwellung und methodischer Trennfehler in Prozent bei 10 Tieren. Die Abweichung ist in SEM angegeben. Die posttraumatische Hemisphärenschwellung betrug  $14,3 \pm 1,2\%$ . Der Trennfehler lag bei  $1,5 \pm 0,2\%$ .

Bei acht Tieren wurde die Ausdehnung des oberflächlichen Hämatoms mit der Schwellung des Hirngewebes korreliert. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen den Parametern festgestellt werden ( $r=0,85$ ;  $p<0,01$ ). Die Intensität der Schwellung stieg mit der Größe der Hämatomausdehnung linear an (Abb. 3.7.).

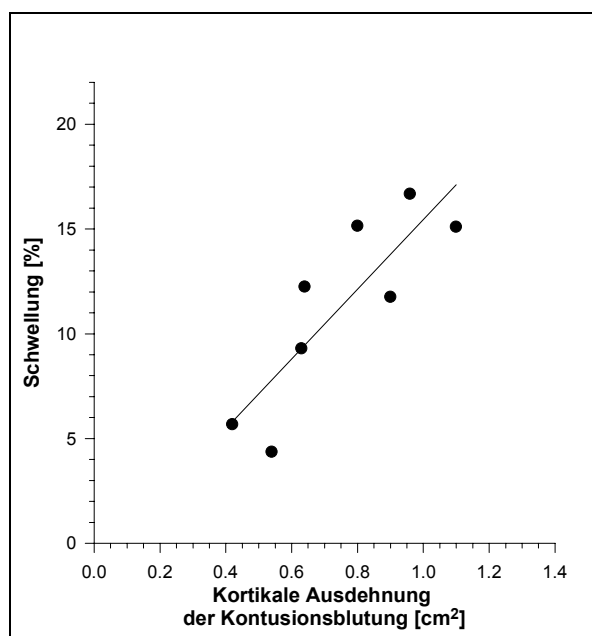


Abb. 3.7.: Korrelation zwischen der kortikalen Ausdehnung des makroskopisch sichtbaren Hämatoms und der posttraumatischen Schwellung bei 8 Tieren. Das Ausmaß des Hämatoms korrelierte signifikant mit der Schwellung ( $p < 0,01$ ;  $r = 0,85$ ).

Der Wassergehalt (Abb. 3.8.) der Hemisphären in nicht traumatisierten und nicht operierten Kontrolltieren wurde rechts mit  $79,82 \pm 0,08\%$  und links mit  $79,77 \pm 0,09\%$  bestimmt. Die Trepanation zur Freilegung des Traumaareals verursachte bei den scheinoperierten Tieren keine Steigerung des Wassergehalts (rechte Hemisphäre:  $79,79 \pm 0,09\%$ ; linke Hemisphäre:  $79,95 \pm 0,18\%$ ). Bei den traumatisierten Tieren stieg der Wassergehalt im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre ( $79,98 \pm 0,07\%$ ) in der traumatisierten Hemisphäre auf  $82,49 \pm 0,17\%$  an. Das Ergebnis ist hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) unterschiedlich gegenüber der kontralateralen Hemisphäre sowie gegenüber den Ergebnissen der scheinoperierten Tiere und der Kontroll-Gruppe.



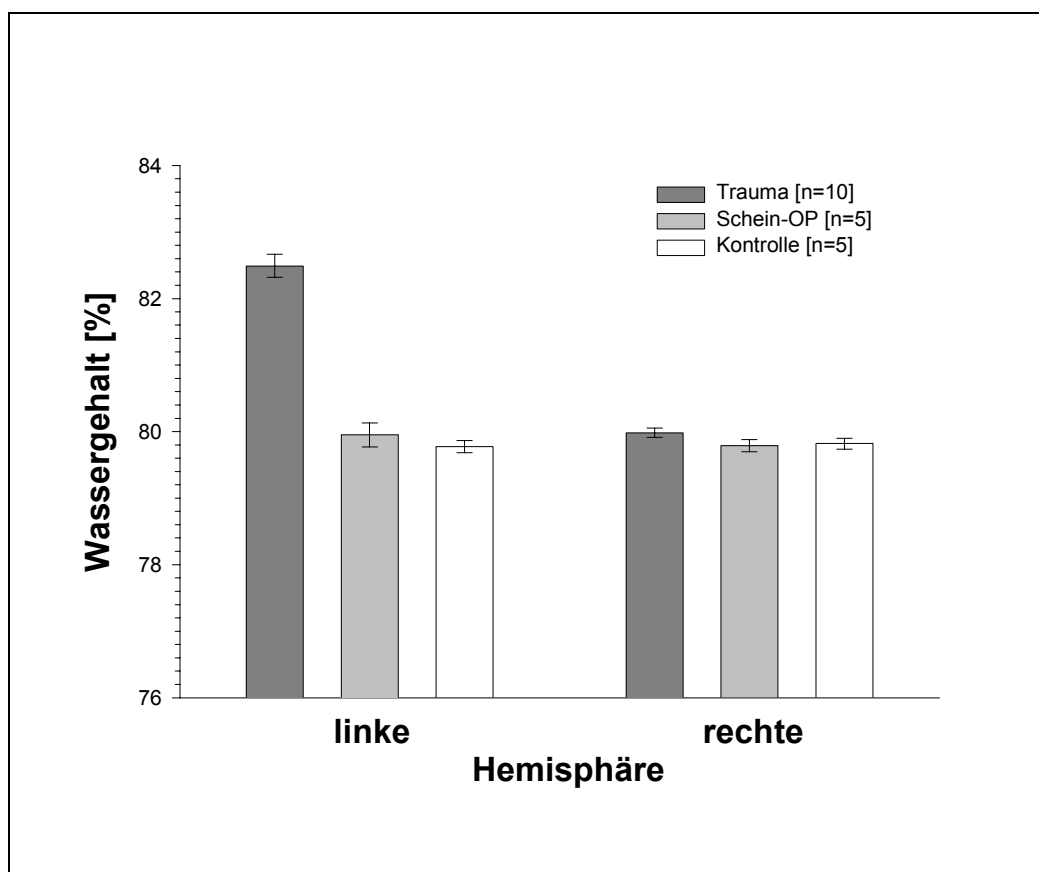


Abb. 3.8.: Wassergehalt von traumatisierten Hemisphären [n=10], von scheineroperierten [n=5] und Kontroll-Tieren [n=5]. Die Abweichung ist in SEM angegeben. Es konnte eine signifikante Zunahme des Wassergehalts in der traumatisierten Hemisphäre ( $82,49 \pm 0,12$  %) gegenüber der kontralateralen nicht traumatisierten Hemisphäre ( $79,98 \pm 0,07$ ) beobachtet werden ( $p < 0,001$ ). Zwischen den scheineroperierten Tieren (links:  $79,95 \pm 0,18$ ; rechts:  $79,79 \pm 0,09$ ) und den Kontrollen (links:  $79,77 \pm 0,09$ ; rechts:  $79,82 \pm 0,08$ ) bestand kein signifikanter Unterschied (ANOVA).

### 3.3.3 Evans Blue-Extravasation

Die Extravasation von Evans Blue (EB) wurde 24 Stunden nach Trauma zur Darstellung und Quantifizierung des vasogenen Hirnödems verwendet. Durch den Übertritt von EB vom intravasalen Kompartiment nach extravasal ist es ein Indikator des posttraumatischen Blut-Hirn-Schrankenschadens. Makroskopisch sah man an der Oberfläche des entnommenen Gehirns die blau angefärbten Areale des Hirngewebes. Diese Areale waren im perikontusionellen Gewebe der traumatisierten Hemisphäre zu finden (Abb. 3.9.). Nach Auftrennung des Gehirns in koronare Schnitte sah man die Verteilung von EB innerhalb der tieferen Gewebeschichten. Das makroskopisch sichtbare EB war im Gewebe unterhalb sowie medial und basal des Kontusionsfokus sichtbar. Es war vornehmlich auf den Kortex und die weiße Substanz des Marklagers beschränkt (Abb. 3.10.). Zur Quantifizierung des in das

Gewebe diffundierte EB erfolgte eine spektrofotometrische Messung. Dabei wurde eine Gesamtmenge von EB von  $6,96 \pm 1,7 \mu\text{g}$  in der traumatisierten Hemisphäre gemessen. Im Vergleich wurde in der kontralateralen Hemisphäre eine EB-Menge von  $2,24 \pm 0,2 \mu\text{g}$  bestimmt. Dies entsprach einer signifikant höheren EB-Konzentration von  $47,28 \pm 11,8 \text{ ng/mg}$  TG in der linken Hemisphäre im Vergleich zu  $15,3 \pm 1,7 \text{ ng/mg}$  TG in der rechten Hemisphäre ( $p < 0,01$ ; Abb. 3.11.).



Abb. 3.9.: Seitenansicht auf die links parieto-temporale kortikale Kontusion 24 Std. nach Trauma. Vor Hirnentnahme erfolgte die 30 minütige i.v. Perfusion des Tieres mit Evans Blue. Die perifokale blaue Färbung des Gewebes ist bedingt durch den Übertritt des intravasalen Evans Blue nach extravasal. Es ist der Indikator des posttraumatischen Blut-Hirn-Schrankenschadens.

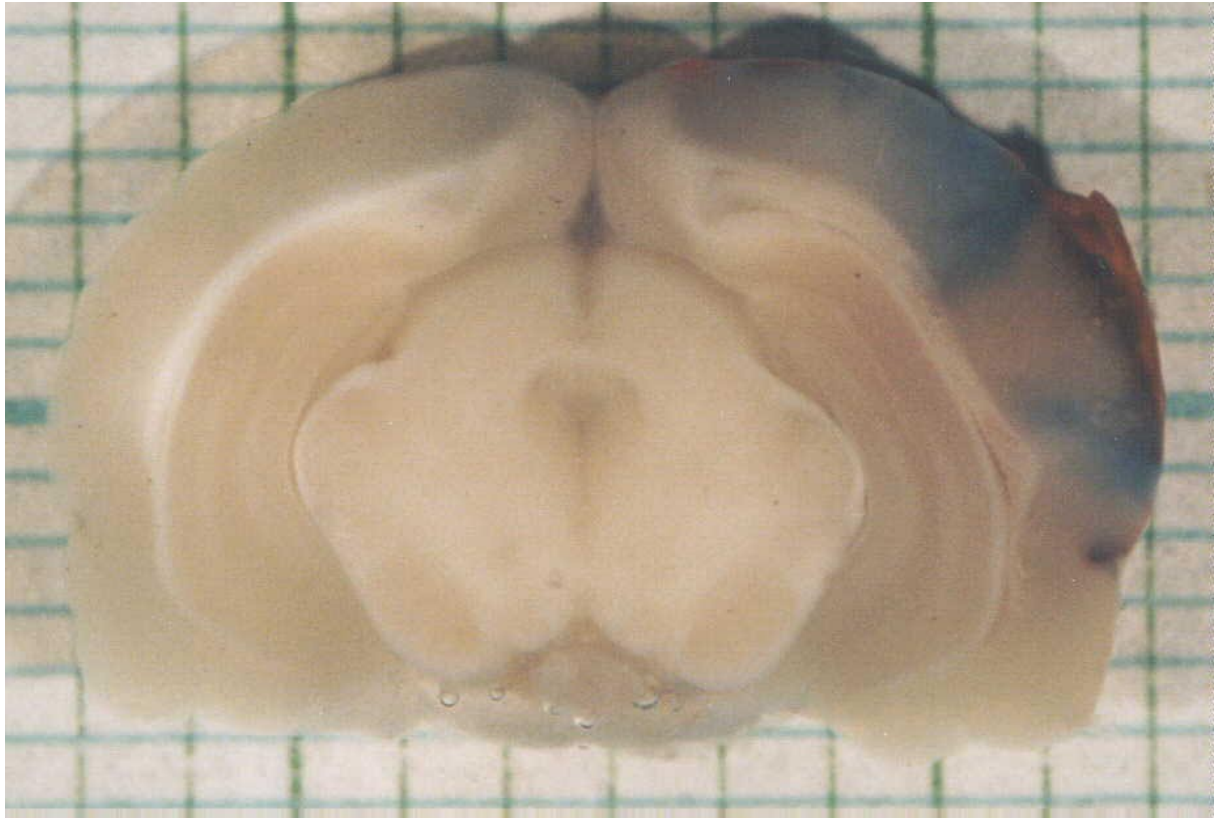


Abb. 3.10.: Koronarer Schnitt des Rattenhirns 24 Stunden nach Trauma mit Darstellung der linksseitigen Kontusion des Gehirns. Die Blaufärbung des perikontusionellen Gewebes ist der Indikator des Blut-Hirn-Schrankenschadens. Es ist ein indirekter Nachweis des vasogenen perifokalen Hirnödems. Links parieto-temporal stellt sich eine Blutauflagerung über dem Kortex dar. Das kortikale Gewebe ist geschwollen und bewirkt die Verlagerung des Marklagers.

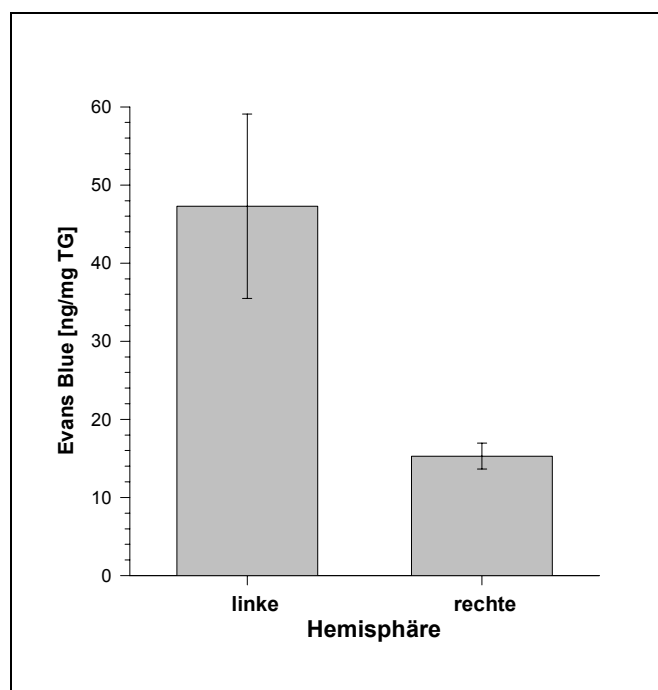


Abb. 3.11.: Spektrophotometrisch nachgewiesenes Evans Blue (EB) bezogen auf das Trockengewicht (TG) der Hemisphären. In der traumatisierten linken Hemisphäre betrug die Menge EB  $47,28 \pm 11,8$  ng/mg TG. Der Anteil EB der kontralateralen Hemisphäre war mit  $15,3 \pm 1,7$  ng/mg TG signifikant geringer ( $p < 0,05$ ; Student *t*-test).

### 3.3.4 Kontusionsvolumen

Das Kontusionsvolumen wurde mit der TTC-Färbung 24 Stunden nach Trauma ermittelt und als kontusionsbedingt untergegangenes Gewebe quantifiziert (Abb. 3.12.). Abb. 3.13. stellt das gesamte Kontusionsvolumen sowie das der einzelnen Hirnschnitte im fronto-kaudalen Verlauf der Läsion dar. Die Volumina der einzelnen Hirnschnitte sind in fronto-kaudaler Richtung mit den Buchstaben A bis G bezeichnet. Entsprechend der Lokalisation des Bolzenschlages auf dem Kortex erreichte die Läsion ihre größte Ausdehnung im parietalen Hirnbereich. Dies entspricht in dem Diagramm den Hirnschnitten E und F. Durch die Begrenzung des Tentoriums überschritt die Läsion nicht den Occipitalpol und ließ das Kleinhirn verschont. Je nach Traumaintensität dehnte sich die Kontusion nach frontal aus, umfaßte aber nie den gesamten Kortex. Das Gesamtvolumen der traumatischen Hirnschädigung betrug  $58,89 \pm 9,1$  mm<sup>3</sup>. Der prozentuale Anteil des Schadens an der linken Hemisphäre betrug  $9,74 \pm 0,86\%$ .

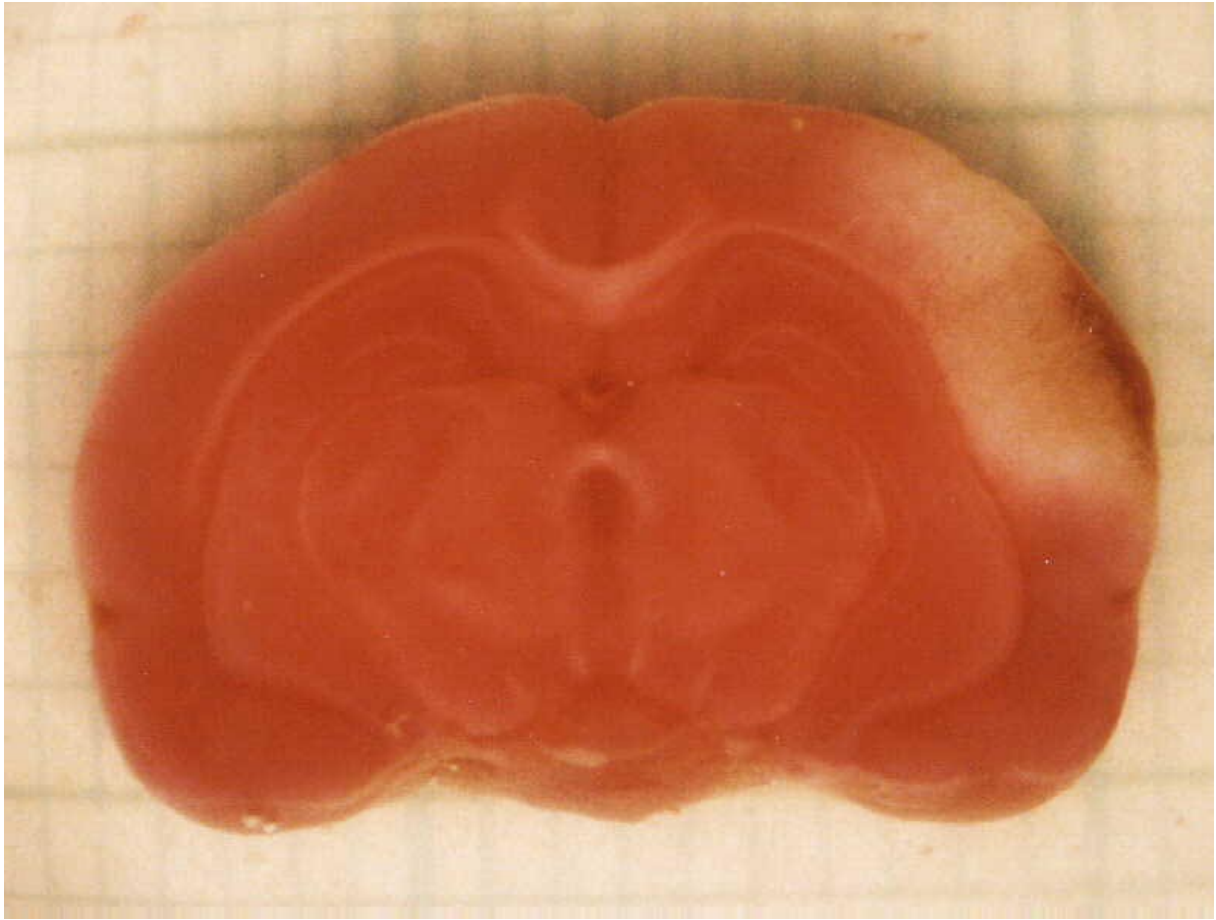


Abb. 3.12.: TTC-Färbung eines koronaren Hirnschnittes mit links parieto-temporaler Kontusion. Kontusiertes Gewebe bleibt in der TTC Färbung weiß und ungefärbt. Das ungeschädigte Gewebe stellt sich rot dar.

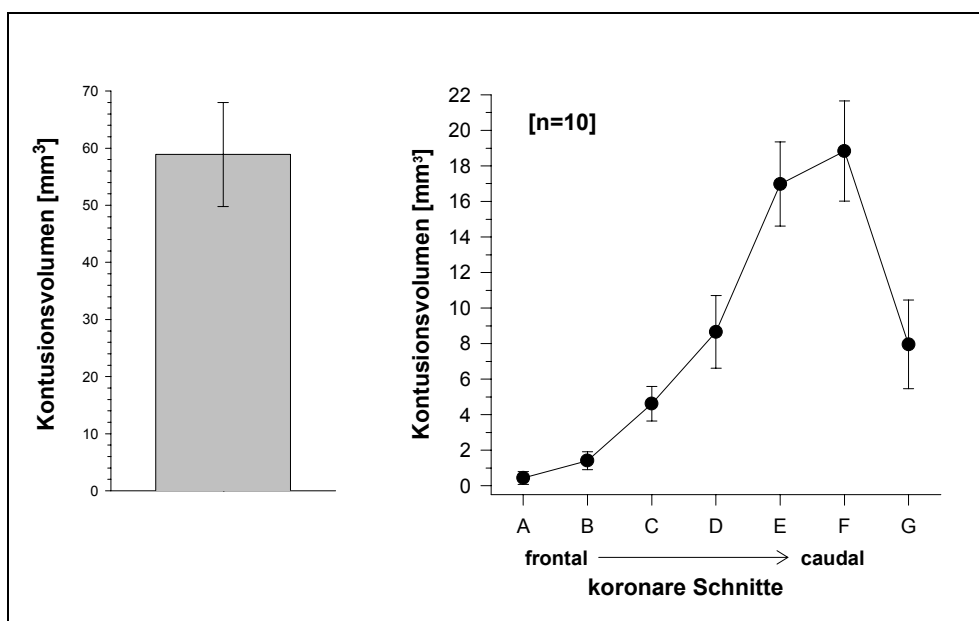


Abb. 3.13.: Kontusionsvolumen quantifiziert anhand der TTC-Färbung. Links ist das durchschnittliche Kontusionsvolumen von insgesamt  $58,89 \pm 9,1 \text{ mm}^3$  dargestellt [n=10]. Die rechte Abbildung zeigt die fronto-kaudale Verteilung der Kontusionsvolumina, die bei den einzelnen Hirnschnitte (A-G) bestimmt wurde. Die größte Ausdehnung der Läsion liegt entsprechend der Lokalisation des Bolzenschlages in den Hirnschnitten E und F. (Abweichungen in SEM).

### 3.4 Histologie

#### 3.4.1 Hämatoxilin-Eosin-Färbung

In der lichtmikroskopischen Übersicht der Hämatoxilin-Eosin (HE) gefärbten histologischen Schnitte stellte sich die Kontusion als zusammenhängendes Areal mit schwächer ausgeprägter Färbung abgegrenzt vom nicht kontusionierten Gewebe dar (Abb. 3.14.a). Die geringere Färbung ergab sich einerseits durch die verringerte Eosinophilie des ödematös aufgelockerten Gewebes sowie durch das gelichtete Zellmuster geschädigter Neurone im Bereich der Kontusion. Diese beiden Charakteristika bildeten gemeinsam eine ähnlich verlaufende Abgrenzung gegenüber dem gesunden Gewebe. Einblutungen zeigten sich vereinzelt im Bereich der Kortexoberfläche, intraparenchymatös sowie im Bereich des Marklagers, so daß man von einer hämorrhagischen Kontusion sprechen kann. Es fanden sich thrombosiert verschlossene Gefäße an der Oberfläche der Kontusion (Abb. 3.14.d) und im tieferen kortikal kontusionierten Gewebe. Perivaskulär zeigten sich vereinzelt Anhäufungen von polymorphkernigen Leukozyten (Abb. 3.14.e).

Die Neurone im Bereich der Kontusion stellten sich mit Anzeichen zellulärer Schädigungen dar. Diese sind nicht einheitlich, sondern lassen sich grob in folgende Untergruppen unterteilen: 1. Neurone mit verdichteter und pyknotisch-geschrumpfter Kernstruktur hoher Basophilie ("dark neurons"), die v.a. im Bereich der Kontusionsgrenzen eine Übergangsregion zu gesundem Gewebe darstellten (Abb. 3.14.b). 2. Neurone mit kaum vom Zytoplasma abgrenzbarer eosinophiler Kernstruktur ("eosinophile Schatten"), die v.a. im Bereich des Kontusionszentrums lokalisiert waren (Abb. 3.14.c). Alle neuronalen Veränderungen waren vornehmlich anhand der Kernstruktur zu identifizieren. Die Areale des Hippokampus, die aufgrund ihrer hohen Sensibilität gegenüber hypoxischen Schädigungen eine besondere Bedeutung einnehmen, waren von der Kontusion nicht erfaßt. Es waren in diesen Untersuchungen im Hippokampus keine neuronalen Veränderungen nachweisbar.

Der morphologische Nachweis eines Hirnödems war in erster Linie anhand der aufgelockerten Struktur des Gewebes nachweisbar. Dies war über den Bereich der eigentlichen Kontusion, im Bereich des Marklagers und im Corpus callosum zu beobachten.



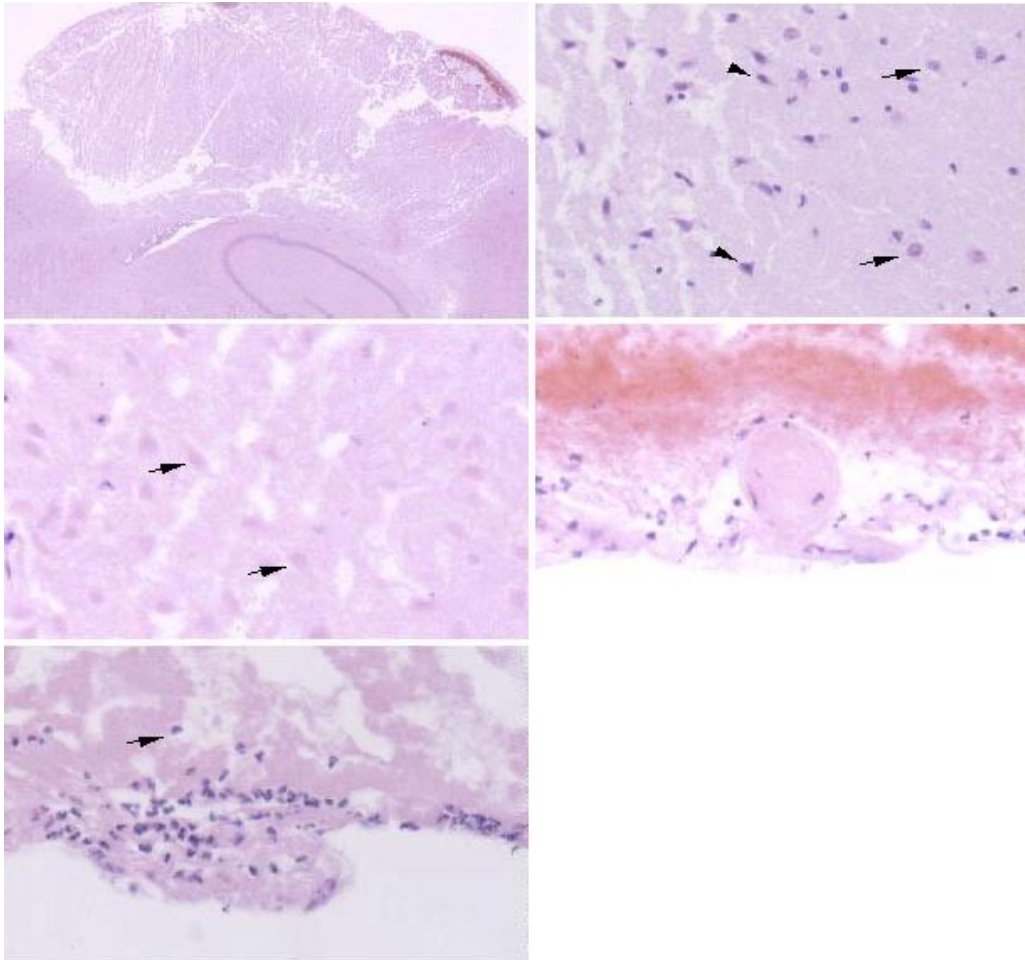


Abb. 3.14. a-f: Paraffinschnitte von Rattengehirnen nach CCII, gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin a) Übersicht des hämorrhagischen Kontusionsareals. Die Kontusion färbte sich insgesamt weniger intensiv als im Vergleich zum gesunden Gewebe. Vergr.: 2,5 fach b) pyknotische Neurone („dark neurons“ – Pfeil ohne Schweif) im Randzonenbereich neben morphologisch intakt erscheinenden Neuronen (Pfeil mit Schweif). Vergr.: 100 fach c) Neurone mit nahezu nicht mehr abgrenzbaren Kernstrukturen („eosinophile Schatten“ - Pfeil). Vergr.: 100 fach d) thromboses piales Gefäß in direkter Lagebeziehung zu einer intrazerebralen Einblutung. Vergr.: 100 fach e) Intraparenchymatöse Infiltrationen von Leukozyten (Pfeil) unter pialen Gefäßen im Bereich der Kontusion. Vergr.: 100 fach

### 3.4.2 Bielschowsky-Färbung

Die Bielschowsky-Färbung dient der Untersuchung mechanischer Schäden der Nervenfasern (Axone). Axonale Schwellkörper („axonal bodies“) sind das morphologische Korrelat für ein rupturiertes Axon, bei denen die Kontinuitätsunterbrechung durch den Aufstau des axonalen Transports zur Anschwellung des proximalen Axonstumpfes führt. Diese axonalen Schwellkörper waren in und um den Bereich des kontusionierten Kortex zu beobachten, v.a. in der Region des Marklagers unterhalb der Kontusion (Abb. 3.15. a/b). Areale außerhalb der unmittelbaren Nachbarschaft zur Kontusion wie die kontralaterale Hemisphäre oder der



Hirnstamm, zeigten keinen axonalen Schaden. Damit ist ein diffuser Axonschaden, d.h. ein auf das gesamte Hirngewebe ausgedehnter Schaden der Nervenfasern, bei dieser Form des traumatischen Hirnschadens ausgeschlossen.

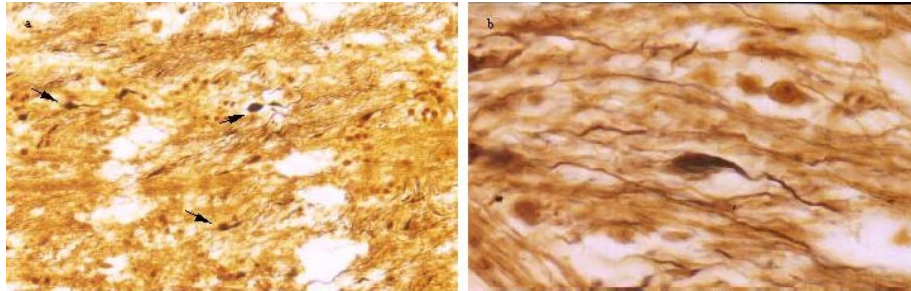


Abb. 3.15.a / b: Axonaufreibung ("axonal bodies") als morphologisches Korrelat für einen mechanischen Axonschaden im Bereich der Kontusion und des darunter gelegenen Marklagers. Sie sind morphologisch charakterisiert durch die Auftreibungen der dunkelbraun gefärbten Axonstümpfe (Pfeile) Vergr.: a) 40 fach; b) 100 fach. Versilberung nach Bielschowsky.

### 3.4.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen des mit Evans Blue (EB) perfundierten traumatisierten Gehirns zeigten die Verteilung der Plasmaproteine im Extravasalraum bei gestörter Blut-Hirn-Schranke. Physiologisch ist die Extravasation von EB im Bereich des Plexus chorioideus und der Glandula pinealis. Pathologische Anreicherungen von EB ließen sich im Extrazellulärraum vor allem im Bereich der Kontusion und des Marklagers nachweisen. Dabei war auffällig, daß das zentrale Kontusionsareal von einer EB-Anreicherung eher ausgespart blieb (Abb. 3.16.a). Im Marklager waren axonale Strukturen durch die EB-Aufnahme markiert (Abb. 3.16.b). Neben der Anreicherung im Extrazellulärraum fanden sich einige zelluläre Strukturen mit fluoreszierender EB-Aufnahme. Anhand der Zytoarchitektur handelte es sich hierbei in erster Linie um Neurone (Abb. 3.16.c). Genauso waren auch strukturell unspezifische Zellen markiert, die nicht in der Gegenfärbung als Neurone identifiziert werden konnten. Die EB-Aufnahme ist somit auch durch Astrozyten und Mikroglia möglich. Bei angeschnittenen Gefäßen ließ sich eine perivaskuläre fluoreszierende Anreicherung nachweisen (Abb. 3.16.d).

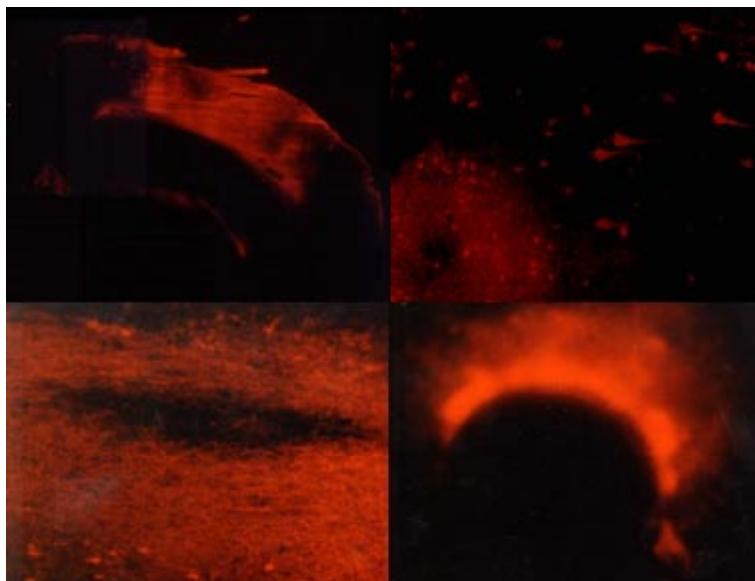


Abb. 3.16. a-d: Fluoreszenzmikroskopische Darstellungen von posttraumatisch angefertigten Gefrierpräparaten der mit Evans Blue perfundierten Gehirne. a) Übersicht der kortikalen Kontusion mit EB-Anreicherung im kontusionellen und perikontusionellen Gewebe mit zentraler Aussparung. Vergr.: 2,5 b) EB-Aufnahme im Marklager benachbart zur Kontusion, extrazelluläre und axonale Anreicherung. Vergr.: 100 c) Intrazelluläre Aufnahme von EB hier in erster Linie durch Neurone, fraglich auch durch Astrozyten und Mikroglia. Vergr.: 100 d) Perivaskuläre Anreicherung von EB. Vergr.: 150

### 3.5 Therapiestudie mit dem 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonisten Bay X 3702

#### 3.5.1 Arterielle Blutgasanalyse

Der arterielle PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub> (aPO<sub>2</sub>, aPCO<sub>2</sub>) und pH war bei allen Messungen im Normbereich. Nur geringfügige Veränderungen der Parameter waren zwischen den Gruppen zu beobachten. Der aPO<sub>2</sub> stieg nach Trauma in beiden Gruppen an. Der aPCO<sub>2</sub> zeigte einen deutlicheren Anstieg in der Placebo-Gruppe. Der pH fiel in der Kontroll-Gruppe ab (Tab. 3.2.).

Tab. 3.2.: Blutgasanalyse direkt vor und 15 Minuten nach Trauma. (Abweichungen als STD; \* p<0,05 vs. Ausgangswert, † p<0,01 vs. Verum; ANOVA)

	aPO <sub>2</sub> [mmHg]		aPCO <sub>2</sub> [mmHg]		pH	
	vor	nach	vor	nach	vor	nach
Bay X 3702	139,8 ± 10,3	176,6 ± 8,9	36,2 ± 1,5	36,5 ± 1,2	7,43 ± 0,01	7,43 ± 0,01
Placebo	141,9 ± 3,0	158,8 ± 5,3*	33,5 ± 3,0	42,5 ± 2,8*	7,45 ± 0,02	7,35 ± 0,03*,†

### 3.5.2 Blutdruckreaktion

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAD) fiel von  $84,3 \pm 2,4$  mmHg vor dem Trauma auf  $79,6 \pm 2,6$  mmHg eine Minute nach Trauma und Injektion des Placebo. Die Werte erholten sich in dem weiteren Verlauf von 30 Minuten. In der Gruppe der mit Bay X 3702 behandelten Tiere (Verum-Gruppe) war ein kontinuierlicher Abfall des MAD nach Trauma und nachfolgender Injektion zu beobachten. Der erste Wert vor Trauma betrug  $82 \pm 2,4$  mmHg. 40 Sekunden nach Trauma war der MAD unterhalb des Wertes der Placebo-Gruppe gefallen. Nach drei Minuten war ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Abfall des MAD gegenüber dem prätraumatischen Wert mit  $70,1 \pm 2,9$  mmHg zu beobachten. Der niedrigste Wert wurde mit  $63,2 \pm 2,1$  mmHg nach zehn Minuten erreicht. Im weiteren Verlauf stiegen die Werte nach 20 und 30 Minuten wieder an. Nach 30 Minuten blieb der MAD mit  $72,1 \pm 2,4$  mmHg signifikant niedriger als der direkt vor Trauma gemessene Wert ( $p < 0,05$ ) (Abb. 3.17.).

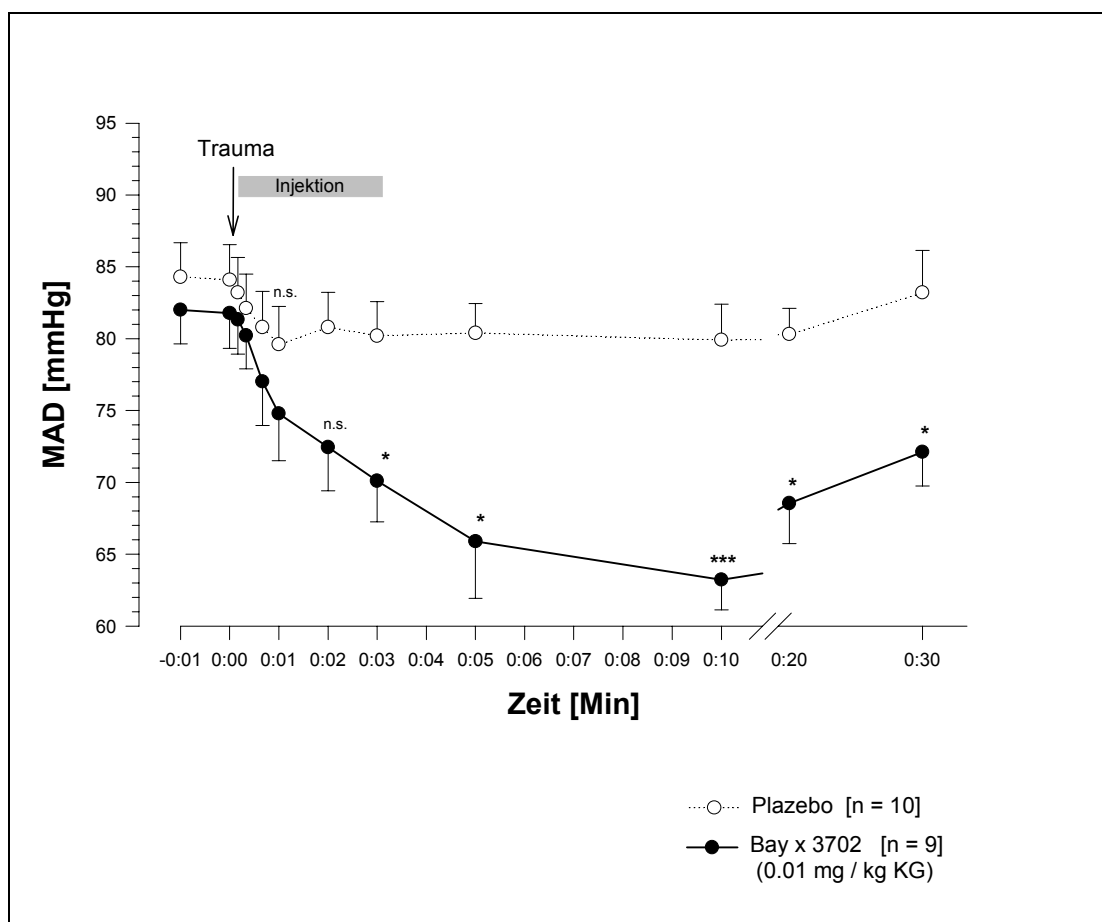


Abb. 3.17.: Reaktion des mittleren arteriellen Blutdrucks auf Trauma und Substanzapplikation (Placebo [n=10] oder Bay x 3702 [n=9]; 0,01mg/kg KG) im Zeitraum bis 30 Minuten nach Trauma. Während in der Placebo-Gruppe keine signifikanten Veränderungen des MAD zu beobachten waren, fiel der MAD 10 Minuten nach Applikation von Bay X 3702 signifikant auf 63,2 mmHg um 22,9%. Nach 30 Minuten blieb der MAD weiterhin signifikant erniedrigt im Vergleich zum prätraumatischen Wert. (Abweichungen als SEM; ANOVA; n.s.: nicht signifikant; \* p<0,05; \*\*\*p<0,001).

Um die Frage zu klären, ob ein weiterer Anstieg des MAD nach 30 Minuten eintritt und ob eine ähnliche Reaktion bei der 2. und 3. Injektion festzustellen ist, wurde bei drei Tieren der MAD über den Zeitraum von 4½ Stunden computergestützt überwacht. Abb. 3.18. zeigt die gemittelten Werte dieser drei Tiere. Hier war ein Blutdruckabfall nach allen drei Injektionen zu beobachten. Bei der ersten und zweiten Injektion wurde der niedrigste Wert (1.Inj.:  $60 \pm 3$  mmHg, 2.Inj.:  $66 \pm 10$  mmHg) nach zehn Minuten erreicht. Der Blutdruck stieg langsam wieder an und liegt nach 50 bis 60 Minuten wieder im Bereich des prätraumatischen Wertes. Nach der dritten Injektion ergab sich eine Erniedrigung des MAD ( $66 \pm 12$  mmHg) bereits nach zwei Minuten. Hiernach stieg der MAD rasch auf einen Wert von  $75 \pm 2,5$  mmHg. In den nachfolgenden 30 Minuten erreichten die Werte nicht den Bereich des prätraumatisch-gemessenen MAD.

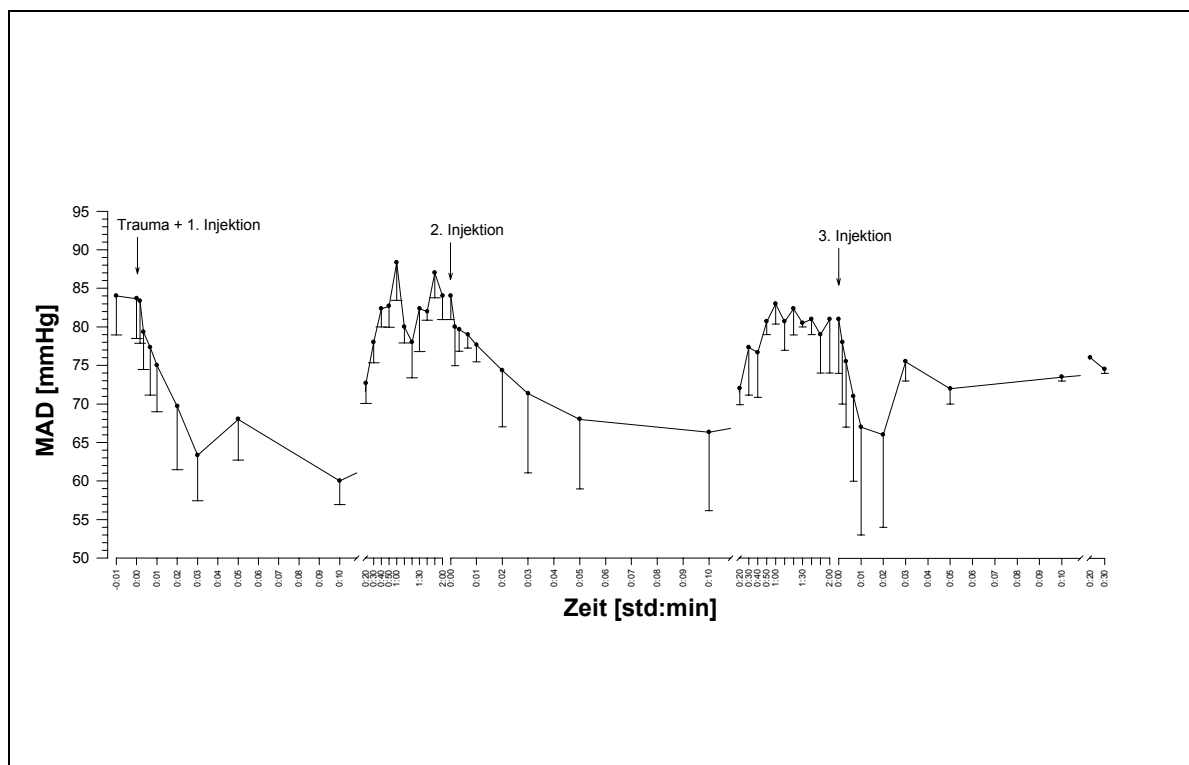


Abb. 3.18.: Langzeitverlauf des Blutdrucks über 4½ Stunden nach Trauma. Es erfolgten Injektionen von Bay X 3702 direkt, 2 und 4 Stunden nach Trauma bei 3 Tieren. Es zeigte sich ein deutlicher Abfall des MAD nach allen drei Injektionen. Die Erholung auf die vor Trauma gemessenen Werte erfolgte 40-50 Minuten nach Injektion.

In Abb. 3.19. ist ein charakteristischer Verlauf der Blutdruckreaktion eines Tieres dargestellt, der durch Computermonitoring mit einer Scanrate von 24 Meßwerten/min erfaßt wurde. Hier zeigte sich ein triphasischer Verlauf nach Substanzapplikation. Ein initialer Abfall des MAD nach Injektion war gefolgt von einer vorübergehenden Erholung des Blutdrucks über wenige Minuten. Dann kam es zu einem erneuten Abfall, der den niedrigsten Wert nach 10 Minuten erreicht. Danach tritt bis zur folgenden Injektion ein kontinuierlicher Anstieg des MAD ein. Diese Blutdruckreaktion wurde bei allen Tieren beobachtet.

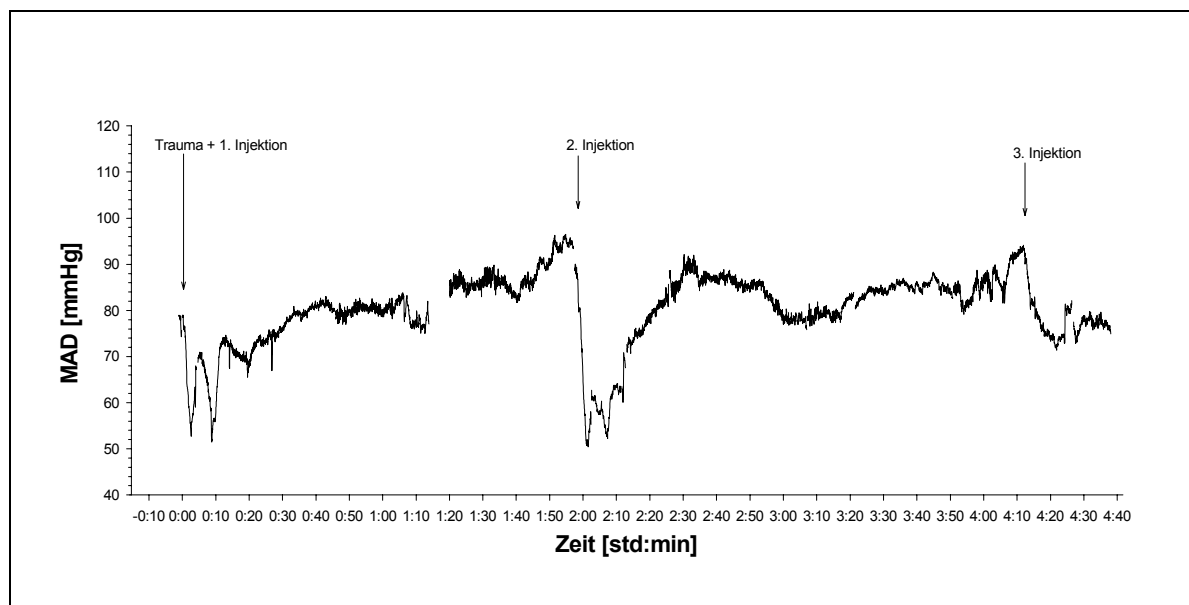


Abb. 3.19.: Blutdruckreaktion eines Tieres nach Trauma und nach drei Injektionen mit 0,01 mg/kg KG Bay X 3702. Erfäßt durch die multimodale Monitoring-Software mit einer Rate von 24 Meßwerten/min. Nach allen drei Injektionen war ein Blutdruckabfall zu beobachten. Nach der ersten und zweiten Injektion war ein triphasischer Verlauf auffällig, indem ein anfänglicher Blutdruckabfall gefolgt von einer kurzzeitigen Erholung und einem erneuten Abfall zu erkennen war. Der Tiefpunkt war nach 10 Minuten erreicht, gefolgt von einem kontinuierlichen Erholung des Blutdrucks.

### 3.5.3 Kontusionsvolumen

Bei den Plazebo-behandelten Tieren wurde ein Kontusionsvolumen von  $58,62 \pm 7,5 \text{ mm}^3$  ermittelt. Bei den Tieren der Verum-Gruppe lag das Volumen des kontusionierten Areals mit  $126,56 \pm 21,8 \text{ mm}^3$  signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als bei der Plazebo-Gruppe (Abb. 3.20.).

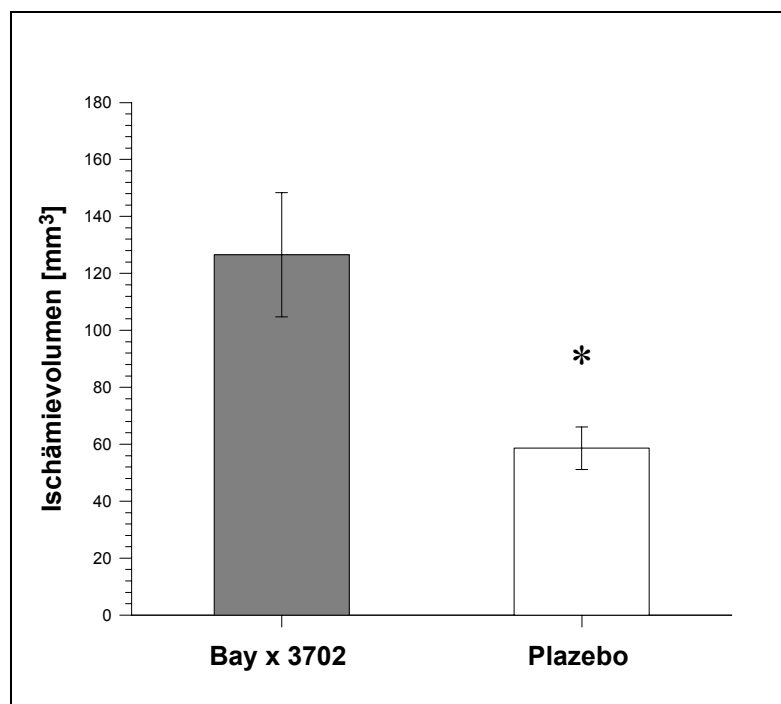


Abb. 3.20.: Kontusionsvolumen 24 Std. nach Trauma. Das Kontusionsvolumen der Bay X 3702 Gruppe (n=10) war mit  $126 \pm 21,8 \text{ mm}^3$  signifikant größer als das der Kontrollgruppe (n=10;  $58,6 \pm 7,5 \text{ mm}^3$ ). Dies entspricht einem relativen Anstieg um 116 %. ( $p < 0,05$ , Mann-Whittney Test).

In Abb. 3.21. sind die gemittelten Blutdruckwerte der hypotensiven Phase von 5 bis 15 Minuten nach Trauma und Injektion mit dem entsprechenden Kontusionsvolumen der einzelnen Tiere aus der Verum-Gruppe korreliert. Die Korrelation war mit einem Koeffizienten von  $r=0,73$  und  $p<0,01$  signifikant.

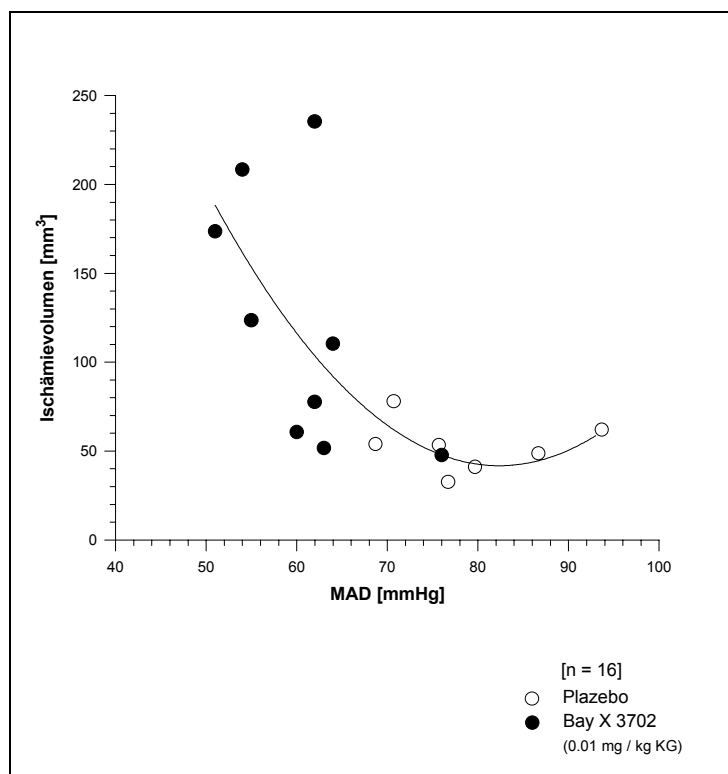


Abb. 3.21.: Korrelation der hypotensiven Blutdruckreaktion mit dem Kontusionsvolumen. Die Mittelwerte der MAD-Werte von 5 bis 15 Minuten nach Trauma wurden den entsprechenden Kontusionsvolumina zugeordnet. Die Korrelation war mit  $p<0,01$  signifikant ( $r=0,73$ ;  $n=16$ ).

### 3.5.4 Hemisphärenschwellung und Wassergehalt

Die Abbildungen 3.22. und 3.23. zeigen die Hemisphärenschwellung und den posttraumatischen Wassergehalt der beiden Versuchsgruppen 24 Stunden nach Trauma. Die Schwellung war mit  $8,56 \pm 0,52\%$  in der Verum-Gruppe nicht signifikant niedriger als in der Plazebo-Gruppe mit  $9,71 \pm 1,22\%$  (Abb. 3.22.).



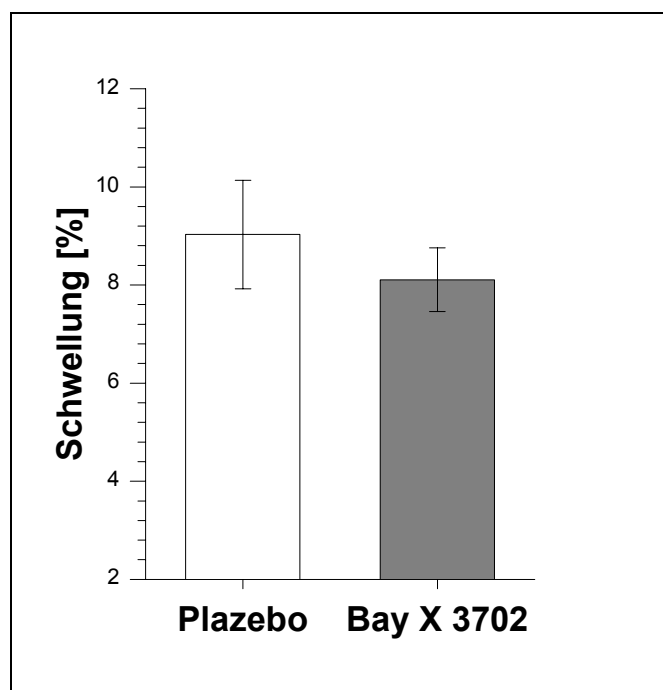


Abb. 3.22.: Posttraumatische Hemisphärenschwellung 24 Std. nach Trauma. Die Schwellung der Bay X 3702 Gruppe (n=10, grau) ist mit  $8,6 \pm 0,5\%$  gegenüber der Kontroll-Gruppe (n=10, weiß) mit  $9,7 \pm 1,2\%$  erniedrigt. Der Unterschied ist nicht signifikant (Abweichungen in SEM, Student *t*-test).

Es war ein signifikanter Anstieg des Wassergehalts der linken Hemisphären gegenüber der kontralateralen Seite in beiden Gruppen zu beobachten ( $p < 0,001$ ). Mit einem Wassergehalt von  $79,46 \pm 0,14\%$  (Plazebo-Gruppe) und  $79,48 \pm 0,09\%$  (Verum-Gruppe) war der Wassergehalt in den kontralateralen rechten Hemisphären annähernd gleich. Auf der kontusionierten Seite waren die Wassergehalte ebenfalls nicht nennenswert unterschiedlich (Bay X 3702-Gruppe:  $80,78 \pm 0,12\%$ ; Plazebo-Gruppe:  $81,02 \pm 0,14\%$ ; Abb. 3.23).

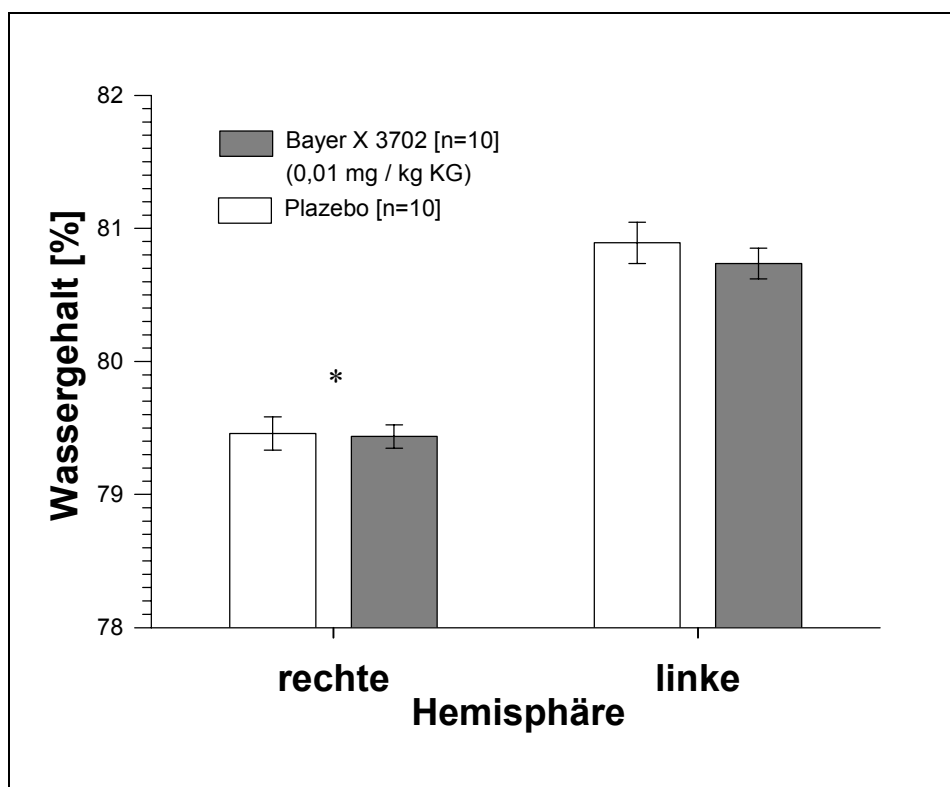


Abb. 3.23.: Posttraumatischer Wassergehalt 24 Std. nach Trauma. In beiden Gruppen war der Anstieg des Wassergehalts in der traumatisierten linken Hemisphäre im Vergleich zur nichttraumatisierten Hemisphäre signifikant (\*  $p < 0,001$ ). Der Wassergehalt in den nichttraumatisierten rechten Hemisphären zeigte in der Bay X 3702-Gruppe ( $79,48 \pm 0,09\%$ ) gegenüber der Placebo-Gruppe ( $79,46 \pm 0,1\%$ ) keinen Unterschied. Der Unterschied in den traumatisierten linken Hemisphären der Verum-Gruppe ( $80,78 \pm 0,1\%$ ) und der Placebo-Gruppe ( $81,02 \pm 0,1\%$ ) war ebenfalls nicht signifikant (Abweichungen in SEM, ANOVA).

Abb. 3.24. zeigt die Korrelation des posttraumatischen Wassergehaltes mit dem jeweils niedrigsten Wert des MAD 15 Minuten nach Trauma und Substanzgabe. Die Korrelation war mit einem  $p=0,07$  und  $r=0,42$  jedoch nicht signifikant.

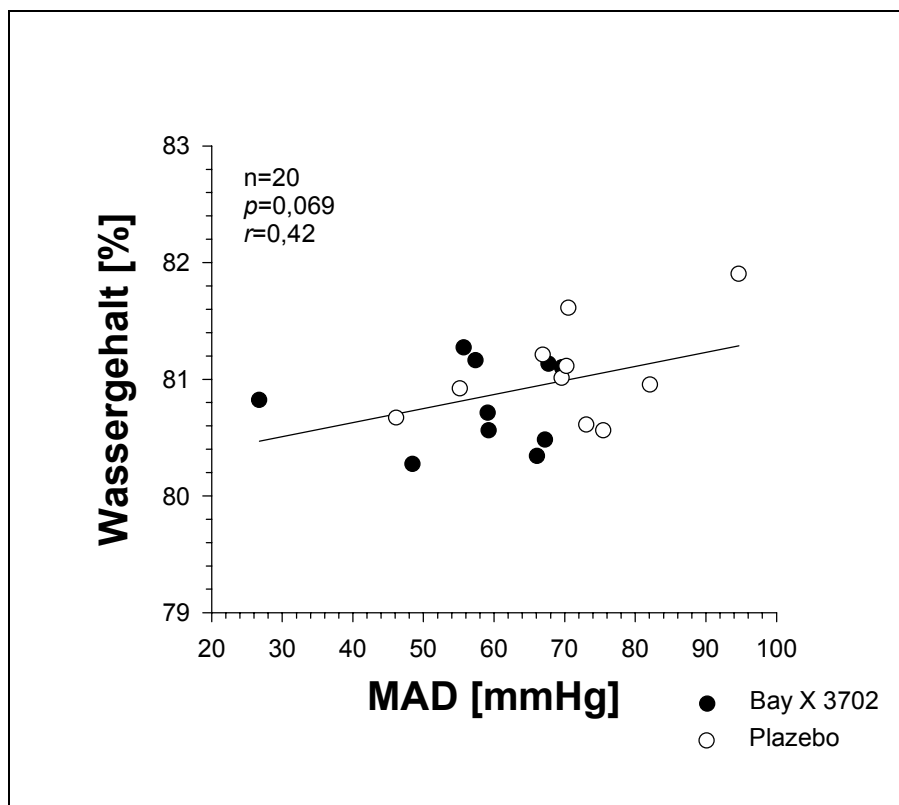


Abb. 3.24. Korrelation zwischen Blutdruckreaktion und posttraumatischem Wassergehalt. Für den MAD wird der Wert 15 Minuten nach Trauma - dem Tiefpunkt der hypotensiven Reaktion - gewählt, und dem entsprechenden Wassergehalt zugeordnet. Die Korrelation war mit  $p=0,07$  nicht signifikant ( $r=0,42$ ).

## 4

## DISKUSSION

## 4.1 Modelle zur Imitation des Schädel-Hirn-Traumas

Die Anforderungen an ein tierexperimentelles Trauma-Modell sind abhängig von der bearbeiteten Fragestellung. Nach Bullock sind die wichtigsten Teilaspekte die fokale Kontusion, die traumatische Blutung, die Ischämie und der diffuse Axonschaden (Bullock, 1997). Das posttraumatische Hirnödem kann als weiterer Teilaspekt hinzugefügt werden. Zum Verständnis des SHT anhand tierexperimenteller Untersuchungen ist es wichtig, zum einen eine möglichst vollständige Nachahmung des komplexen Krankheitsbildes zu gewährleisten und zum anderen einzelne Teilaspekte getrennt voneinander zu untersuchen. Deshalb haben sich in den letzten Jahren verschiedene Trauma-Modelle parallel etabliert. Tierexperimentelle Trauma-Modelle sind jedoch häufig ein Kompromiß zwischen einer möglichst vollständigen Imitation des menschlichen Schädel-Hirn-Traumas und der Nachahmung eines beim SHT wichtigen Teilaspekts. Erst das Zusammenfügen verschiedener Ergebnisse mehrerer Modelle kann langfristig ein besseres Verständnis des Krankheitsbildes SHT ermöglichen.

In den letzten Jahren sind in der SHT-Forschung Tiermodelle an Kleintieren, besonders Nagetieren, immer häufiger zur Anwendung gekommen. Dixon beschreibt die damit zusammenhängenden Vor- und Nachteile (Dixon und Hayes, 1997). Als Vorteile werden genannt: 1. Einfache anästhetische und chirurgische Handhabung während der Versuchsdurchführung, 2. Wissen um Normwerte in einer Vielzahl von physiologischen und verhaltensorientierten Variablen, 3. Kompatibilität mit einer Vielzahl von neurochemischen und histologischen Techniken, über die eine große Erfahrung im Vergleich zu anderen Spezies besteht, 4. hohe Resistenz gegenüber Infektionen, 5. präzise Daten über Alter, Gewicht und genetischen Hintergrund der Tiere, 6. geringer finanzieller Aufwand in Beschaffung und Versorgung der Tiere, 7. ökonomischer und effizienter Einsatz von Pharmaka und teuren Reagenzien aufgrund des geringen Körpergewichts. Als Nachteile werden genannt: 1. Unterschiede der neuroanatomischen Strukturen und der Massenrelationen von Hirngewebe, Schädel und extrakraniellen Weichteilen im Vergleich zum Menschen, 2. kleinere Strukturen komplizieren die Untersuchungsmethoden, 3. unzureichende Erfassung von komplexeren neurologischen Ausfällen.

Die am häufigsten verwendeten Modelle sind an Ratten durchgeführt worden. Es soll im folgenden versucht werden, die in den letzten Jahren etablierten Tiermodelle des SHT zu beschreiben und das in dieser Arbeit verwendete Trauma-Modell in ihren Kontext zu setzen. Drei Modelle sollen für diesen Vergleich herangezogen werden: 1. Modell der kortikalen Kälteläsion, 2. das sog. "Weight Drop"-Modell und 3. das "Fluid Percussion"-Modell (Dixon et al., 1987; Klatzo et al., 1958; Marmarou et al., 1994). Tabelle 4 zeigt einen Überblick der Ausprägung der einzelnen Teilaspekte bei diesen drei Modellen und das CCII, wie sie auch im folgenden beschrieben werden.

#### *4.1.1 Modell der kortikalen Kälteläsion*

Die kortikale Kälteläsion wurde von Klatzo (Klatzo et al., 1958; Klatzo et al., 1967) eingeführt, und unter den hier beschriebenen ist es das älteste Modell einer experimentellen Hirnläsion. Es galt lange Zeit als ein einfaches, standardisiertes und relevantes SHT-Modell und wurde in vielen Aspekten untersucht (Eriskat et al., 1994; Schneider et al., 1994; Unterberg et al., 1994; von Berenberg et al., 1994). Hierbei wurde auf den freigelegten Kortex der Ratte ein Kältestempel mit definierter Temperatur, Größe und Zeit gesetzt. Es entsteht eine kortikale Kältenekrose, die von einer Grenzzone mit geschädigtem Endothel und damit gestörter Blut-Hirn-Schranke umgeben ist. Dieses bewirkt die Entstehung eines vasogenen Hirnödems, welches aufgrund der erhöhten Permeabilität der Gefäße für Albumin und andere Plasmaproteine durch ein proteinreiches Exsudat charakterisiert ist. Die Durchführung dieser Methode zeichnet sich im besonderen durch eine einfache Handhabung aus. Das Modell erfüllt wichtige Kriterien einer konsistenten Datenerhebung, wie die Reproduzierbarkeit und die geringe Streuung der Ergebnisse. Histopathologisch zeigt sich eine gut abgrenzbare Nekrose, die durch pyknotisch veränderte Neurone, eine reaktive Gliose und eine ausgeprägte Störung der Blut-Hirn-Schranke gekennzeichnet ist. Die Ödemausbreitung wurde innerhalb und perifokal der Nekrose beschrieben. Das Ödem entwickelt sich entlang der weißen Substanz, über das Corpus callosum zur kontralateralen Hemisphäre bis hin zur Aufnahme der Ödemflüssigkeit in das Ventrikelsystem (Kamada et al., 1995; Vorbrodt et al., 1985). Die maximale Ausdehnung des posttraumatischen Hirnödems ist 24 Stunden nach Läsion zu beobachten (Schneider et al., 1994). Die Ödemauflösung erfolgt über das Ventrikelsystem und die Venolen (Vorbrodt et al., 1985). Anhand dieses Modells wurde z.B. die Dynamik des

vasogenen Hirnödems mit Hilfe der Extravasation von Evans Blue beschrieben (Unterberg et al., 1994). Der zerebrale Blutfluß ist direkt nach Trauma gesteigert und normalisiert sich nur langsam in den nachfolgenden 24 Stunden. Es werden nur leichte Gewebeeinblutungen beobachtet, wobei die Kortexoberfläche keine Blutauflagerungen zeigt (Klatzo et al., 1967).

Die entscheidende Kritik an diesem Modell ergibt sich aus der fehlenden mechanischen Einwirkung als Ursache der Läsion. Hieraus folgt die mangelhafte direkte Übertragbarkeit auf die klinische Situation des SHT. Trotzdem lassen sich einige Parallelen in der Pathophysiologie zu einer mechanischen Läsion aufzeigen. Im Vordergrund steht die Dynamik des Blut-Hirn-Schrankenschadens. Die Rechtfertigung dieses Modells liegt v.a. in der Untersuchung dieses Teilaspektes des SHT. Lange Zeit wurde das vasogene Hirnödem als dominierender Faktor des SHT angesehen. In jüngerer Zeit haben aber vergleichende Studien mit anderen Modellen des SHT unter Anwendung computertomographischer und magnetresonanztomographischer Untersuchungen diese Überlegung relativiert (Bullock et al., 1990; Ito et al., 1996; Kochanek et al., 1995; Tornheim et al., 1984; Unterberg et al., 1996). Vielmehr zeigt sich die parallele Entstehung von sowohl zytotoxischem und vasogenem Hirnödem nach mechanisch induzierter kortikaler Kontusion.

#### *4.1.2 Weight Drop-Modell*

Das Weight Drop-Modell wurde von Marmarou und Mitarbeitern entwickelt (Marmarou et al., 1994). Hierbei fällt ein definiertes Gewicht, geführt durch eine Plexiglasschiene, aus einer definierten Höhe mit Erdbeschleunigung auf den intakten Schädel. Der Schädel wird dabei durch eine im Durchmesser 8 mm große Stahlplatte geschützt, die auf der Mittellinie zwischen Bregma und Lambda direkt am Knochen fixiert ist. Dadurch wird eine Schädelfraktur vermieden. Fallhöhe und Masse des Gewichts sowie die Konsistenz und Elastizität eines Schaumstoffblocks, auf dem der Kopf des Tieres gelagert ist, bestimmen die Traumastärke. Das Trauma verursacht eine diffuse Schädigung des Hirngewebes. Es ist keine fokale Hirnläsion nachweisbar. Leichte petechiale Einblutungen im Hirnstammbereich sowie subarachnoidale Einblutungen in den basalen Zisternen und intraventrikuläre Einblutungen (Foda und Marmarou, 1994; Kita und Marmarou, 1994) konnten dabei nach Trauma gezeigt werden. Das Trauma bewirkt eine diffus ausgedehnte neuronale, axonale und mikrovaskuläre Schädigung, wobei der diffuse Axonschaden im Vordergrund steht (Foda und Marmarou,

1994). Im Rahmen der Quantifizierung des posttraumatischen Hirnödems durch Bestimmung von Wassergehalt und Evans Blue-Extravasation konnten Kita und Mitarbeiter keine Unterschiede zu scheinoperierten Tieren nachweisen (Kita und Marmarou, 1994). Demgegenüber zeigen die Untersuchungen von Van den Brink und Mitarbeitern einen Anstieg des zerebralen Wassergehalts 24 Stunden nach Trauma (Van den Brink et al., 1990). Histologisch wurde das morphologische Korrelat eines Hirnödems in Form von perikapillären Astrozytenschwellungen beobachtet (Foda und Marmarou, 1994). Der zerebrale Blutfluß, der lokal im Randbereich des aufschlagenden Gewichtes mit einer Laser-Doppler-Flowmetrie-Sonde gemessen wurde, zeigte keine signifikante Reduktion direkt nach dem Traumaereignis. In der Zeit 2 bis 4 Stunden nach Trauma wurde eine hyperämische Phase mit Werten von 250 - 390 % des Ausgangswertes beschrieben (Ito et al., 1996).

Das Modell von Marmarou und Mitarbeitern stellt den Aspekt der diffusen Hirnschädigung in den Vordergrund. Eine fokale Kontusion wird nicht beobachtet. Deshalb ist die Quantifizierung des posttraumatischen Hirnschadens nur bedingt möglich. Dieses Modell ist deshalb nur schwer mit dem in dieser Arbeit verwendeten Trauma-Modell vergleichbar. Vielmehr handelt es sich um ein Modell, das eine Ergänzung zum Controlled Cortical Impact Injury darstellt. Es werden andere Teilaspekte des SHT, wie der diffuse Axonschaden und die Subarachnoidalblutung, stärker imitiert, die im CCII weniger stark ausgeprägt sind.

#### *4.1.3 Fluid Percussion-Modell*

Das Fluid Percussion-Modell ist das in jüngster Zeit am weitesten verbreitete SHT-Modell. Vorgestellt wurde es 1987 von Dixon und Mitarbeitern und von McIntosh und Mitarbeitern für die Ratte (Dixon et al., 1987; McIntosh et al., 1987). Es ist eine Modifikation des erstmals 1965 vorgestellten Trauma-Modells beim Kaninchen (Lindgren und Rinder, 1965). Beim letzteren wird ein Pendel verwendet, das mit einem definiertem Gewicht, aus definierter Höhe auf das Ende eines mit Flüssigkeit gefülltem Zylinders schlägt. Es entsteht ein Flüssigkeitsimpuls, der über ein erweitertes Bohrloch direkt auf die Kortexoberfläche übertragen wird. Dadurch resultiert ein kurzzeitiger intrakranieller Druckanstieg und die Deformation des Hirngewebes. Die Stärke des Druckimpulses wird über eine im Zylinderinneren lokalisierte Drucksonde erfaßt und in Atmosphären (atm) angegeben.

Dadurch ist die Kontrolle der Traumastärke möglich, die durch Schlaghöhe und Gewicht des Pendels reguliert werden kann.

Das Fluid Percussion-Modell nach Dixon, bei dem die Applikation des Druckimpulses im Bereich der Mittellinie erfolgt, produziert ein diffuses Trauma des Hirngewebes. Eine fokale Kontusion wird nicht beobachtet. Vielmehr finden sich diffuse Nervenfaserschäden im Kortex, den Basalganglien und im Hirnstamm. Intraparenchymatöse petechiale Blutungen finden sich im Kortex, Marklager, Hippokampus, in den Basalganglien und im Hirnstamm. Subarachnoidale Einblutungen werden vereinzelt im Bereich der Traumaapplikation beobachtet, während eine Subduralblutung nicht nachweisbar ist. Nekrotische Veränderungen mit neuronalem Zelltod sind v.a. im Kortex lokalisiert (Dixon et al., 1987). Bei der seitlichen Applikation des Fluid Percussion Traumas, wie sie von McIntosh und Mitarbeiter (McIntosh et al., 1989) durchgeführt wird, sind die Merkmale einer Kontusion deutlicher zu beobachten. Hier ist der Anteil der intraparenchymatösen Blutung sowie des nekrotischen Zelluntergangs auf den ipsilateralen Kortex konzentriert, jedoch sind auch hier diffuse Läsionen der Basalganglien und des Hirnstamms beschrieben worden. Ein posttraumatischer Zelluntergang im Bereich des Hippokampus wird beim lateralen Fluid Percussion nachgewiesen (Cortez et al., 1989). In beiden Einstellungen des Trauma-Modells wird ein diffuser Axonschaden beobachtet. Dieser ist vornehmlich im Bereich des Hirnstamms lokalisiert und war im Bereich des zerviko-medullären Übergangs am deutlichsten ausgeprägt (Dixon et al., 1987; Shima und Marmarou, 1991). Der Axonschaden stellt ein entscheidendes Charakteristikum des Fluid Percussion-Modells dar und grenzt es von den anderen Trauma-Modellen ab.

Dixon beobachtet bei allen Tieren nach Fluid Percussion im Rahmen einer umfassenden neurologischen Untersuchung sowohl direkt nach Trauma als auch Tage nach Trauma funktionelle und psychomotorische Störungen (Dixon et al., 1987). Reduktion des zerebralen Blutflusses bis sechs Stunden nach Fluid Percussion-Trauma werden in unterschiedlichen Bereichen des Gehirns bestimmt. Es werden jedoch keine Areale mit ischämischen Perfusionswerten beschrieben (Dewitt et al., 1988; Yamakami und McIntosh, 1989; Yuan et al., 1988). Das posttraumatische Hirnödem nach Fluid Percussion ist im zeitlichen Verlauf von Soares und Mitarbeiter quantifiziert worden. Im Bereich des traumatisierten Kortex wird der stärkste Anstieg des Gewebswassergehaltes 24 und 48 Stunden nach Trauma gemessen (Soares et al., 1992). In Untersuchungen des posttraumatischen Blut-Hirn-Schrankenschadens ist eine Extravasation von Evans Blue als Indikator des vasogenen Hirnödems beim Fluid



Percussion im Hirngewebe nachweisbar (Cortez et al., 1989; McIntosh et al., 1987; McIntosh et al., 1989). Der größte Anstieg der Evans Blue-Extravasation ist 6 Stunden nach Trauma beobachtet worden (Cortez et al., 1989).

Das Fluid Percussion-Modell des traumatischen Hirnschadens bei der Ratte hat sich im Bereich der experimentellen Traumaforschung deswegen weit verbreitet, weil es viele Teilaspekte des menschlichen SHT widerspiegelt. Die entscheidenden Nachteile des Modells liegen in der mit dem Trauma assoziierten Läsion des Hirnstamms, welche beim Menschen nicht als typischer Teilaspekt von traumatischen Hirngewebsalterationen beobachtet wird (Dixon und Hayes, 1997). Die Handhabung und der technische Aufwand des Modells ist aufwendiger als die der vorher genannten Trauma-Modelle. Daraus resultiert eine größere Streuung der erhobenen Daten (Dixon und Hayes, 1997). Der Vorzug des Modells liegt in der Möglichkeit, einen diffusen mechanisch-induzierten neuronalen Zelluntergang und die damit verbundenen metabolischen Alterationen zu untersuchen.

#### 4.1.4 *Controlled Cortical Impact Injury*

Das Trauma-Modell der pneumatisch gesteuerten mechanischen Kontusion ist erstmals als Modell des spinalen Traumas vorgestellt worden (Andersen, 1982; Kearney et al., 1988). Lighthall und Mitarbeiter beschrieben 1988 die modifizierte Version des traumatischen Hirnschadens beim Frettchen (Lighthall, 1988), und Dixon und Mitarbeiter modifizierten das Modell für die Ratte, so wie es in den hier dargestellten Untersuchungen verwendet wurde (Dixon et al., 1991). Die Funktionsweise des Modells wird in dieser Arbeit im 2. Kapitel eingehend beschrieben. Die meßbaren mechanischen Daten wie Geschwindigkeit, Deformationstiefe und Kontaktzeit der Traumaapplikation gewährleisten eine hinreichende Kontrolle über die Reproduzierbarkeit des Modells. Die Applikationsform durch den starren pneumatisch gesteuerten Schlagbolzen erlaubt eine exakte und zuverlässige Traumatisierung der Kortexoberfläche. Die kontrollierbare Variation der Parameter liefert die Möglichkeit einer weiten Spanne unterschiedlicher Traumastärken.

Die für diese Arbeit durchgeführten makroskopischen und histologischen Untersuchungen zeigen, daß der Teilaspekt der Kontusion bei diesem Modell im Vordergrund steht. Damit assoziiert sind auch alle mit dem Trauma in Verbindung zu bringenden Blutungstypen. Bei

hoher Traumastärke ist eine ausgeprägte subdurale Einblutung zu beobachten. Im Bereich unterhalb des Traumas befinden sich subarachnoidale Blutungen, und intraparenchymatöse Blutungen im Kortex und Marklager. Das Kontusionsareal ist histologisch anhand neuronaler Zellschädigungen und Zelluntergänge vom übrigen Gewebe gut abgrenzbar, so daß dessen Größenausdehnung gut durch morphometrische Methoden quantifiziert werden kann. Im Gegensatz zu den vergleichbaren Trauma-Modellen ist eine diffuse Hirnschädigung nicht nachweisbar. Es werden keine vereinzelt diffusen neuronalen Schädigungen in Bereichen des Hippokampus oder der Stammganglien, beobachtet. In einzelnen Fällen läßt sich bei stärkerer Traumastärke in der kontralateralen Hemisphäre eine Contrecoup-Läsion nachweisen, der jedoch eine deutlich geringere Ausdehnung besitzt als die Kontusion. Was Zellschädigungen im Bereich des Hippokampus anbelangt, zeigen andere Untersuchungen zwei Wochen nach Trauma einen verzögerten Zelluntergang in den CA1 und CA3 Regionen, die gegenüber Minderperfusion als besonders vulnerabel gelten (Colcios et al., 1996; Goodman et al., 1994). Ein axonaler Schaden ist nur in direkt perikontusionellen Arealen zu beobachten. Die kontralaterale Hemisphäre und der Hirnstamm sind frei von axonalen Schäden. In der Beurteilung des posttraumatischen Ödems läßt sich ein signifikanter Anstieg des Wassergehalts sowie der posttraumatischen Schwellung nachweisen. Der Blut-Hirn-Schrankenschaden und damit der Anteil des vasogenen Hirnödems konnte durch Extravasation von Evans Blue in der hier vorliegenden Untersuchung gezeigt werden. Der posttraumatische zerebrale Blutfluß ist innerhalb der Kontusion im Vergleich zum gesundem Gewebe signifikant reduziert (Cherian et al., 1994; Forbes et al., 1997). In anderen Studien zeigt der regionale zerebrale Blutfluß im Areal der Kontusion ischämische Werte. Die Areale direkt um diese Ischämie-Zone zeigten eine Hyperperfusion in den ersten Stunden nach Trauma (Bryan et al., 1995; Sutton et al., 1994). Benachbarte Areale zur Kontusion wie die Stammganglien und der Hippokampus waren ebenfalls nach Trauma minderperfundiert (Bryan et al., 1995).

Die Untersuchungen am Controlled Cortical Impact Injury zeigen, daß viele Aspekte des Schädel-Hirn-Traumas beteiligt sind. Im Vordergrund steht der Teilaspekt der kortikalen Kontusion mit einer fokalen, hämorrhagischen Nekrose. Ein diffuses Trauma wird hierbei nicht beobachtet. Daraus ergibt sich der Vorteil einer gut quantifizierbaren traumatischen Läsion, was für die Anwendung des Modells in vergleichende Studien von großer Bedeutung ist. Die Überwachung der Parameter, die für die Veränderung der Traumastärke wichtig sind,

ermöglicht sowohl eine gute Reproduzierbarkeit als auch eine kontrollierte Variation der Traumastärke.

Tab. 4.: Repräsentation der Teilaspekte des SHT in verschiedenen tierexperimentellen Modellen (modifiziert nach Povlishock, 1997).

	Kälteläsion	Weight Drop	Fluid Percussion	CCH
<b>Kontusion</b>	-	-	-/+	+++
<b>Subdurales Hämatom</b>	-	-	-	+
<b>Subarachnoidalblutung</b>	-	++	+	+
<b>Intrazerebrales Hämatom</b>	+	+	++	++
<b>neuronaler Zellschaden</b>	+++	+	++	+++
<b>Axonschaden</b>	-	+++	++	+
<b>BHS Störung</b>	+++	-/+	++	++
<b>Perfusionsstörungen</b>	+	++	++	++

#### 4.1.5 Handhabung des Modells

Nach dem Überblick der wichtigsten Trauma-Modelle wird im folgenden die Handhabung des Controlled Cortical Impact Injury im einzelnen diskutiert.

In den vorgestellten Untersuchungen konnte anhand verschiedener Parameter gezeigt werden, daß das Controlled Cortical Impact Injury eine reproduzierbare Kontusion verursacht. Die Überwachung von Schlagbolzengeschwindigkeit während der Versuche, die genaue Einhaltung gleicher Kontaktzeiten des Bolzens mit der Kortexoberfläche, die exakte Positionierung des Tierschädels in der stereotaktischen Halterung und die genaue Einstellung der Deformationstiefe gewährleiten die Erhebung von standardisierten Daten mit geringer Streuung. Dadurch ist die Quantifizierung der posttraumatischen Veränderungen für eine repräsentative Traumastärke möglich. Trotzdem beinhaltet die Versuchsdurchführung Schwachpunkte, deren Kontrolle bei der Durchführung nicht sicher objektivierbar ist. Dixon und Hayes charakterisierten diese Variationspunkte wie folgt: 1. Einschlagwinkel des Schlagbolzens, 2. Größe und Lokalisation der Kraniotomie, 3. Justieren der "Nullposition" des Bolzens im Verhältnis zur Hirnoberfläche, 4. Narkoseprotokoll und Beatmungshilfen (Dixon und Hayes, 1997). Diese Variationen gestalten einerseits individuelle Einstellungsmöglichkeiten entsprechend spezieller Fragestellungen, andererseits sind sie aber potentielle Quellen für eine unzureichende Standardisierung. Deshalb sind für den

Untersucher bei der Versuchsdurchführung folgende wichtige Punkte als Voraussetzungen einer hinreichenden Standardisierung zu beachten:

Vor Beginn einer Studie sollte die Tischposition und Bolzeneinschlagwinkel eine feste Einstellung finden, deren Position während der Studie nicht mehr verändert wird. Weiterhin muß ein Regime für die Einhaltung einer bestimmten Traumastärke festgelegt werden, so daß Schlaggeschwindigkeit und Kontaktzeit bis zum Abschluß der Studie konstant eingehalten werden. Narkoseprotokoll und Beatmungshilfen müssen bei allen Tieren einer Studie identisch sein. Die Versuchsabläufe der Trepanation hinsichtlich Position und Größe, die Lagerung des Kopfes in der stereotaktischen Halterung und die Einstellung des Bolzen zu der Kortexoberfläche und den Trepanationsrändern ("Nullposition") ist dennoch nicht exakt zu objektivieren. Um dieses Problem so gering wie möglich zu halten, sollten diese Abläufe innerhalb einer Studie stets von der selben Person durchgeführt werden. Nur so sind diese Schwachpunkte des Modells zu umgehen und eine exakte Datenerhebung zu gewährleisten.

Es ist gezeigt worden, daß unterschiedliche Traumastärken durch die Feineinstellung verschiedener Parameter wie Geschwindigkeit und Eindringtiefe des Schlagbolzens justierbar sind. Cherian und Mitarbeiter (Cherian et al., 1994) zeigten, daß durch die Variation dieser Parameter die Charakterisierung verschiedener Traumastärken anhand posttraumatischer Reaktionen möglich ist. Dabei waren ein höherer intrakranieller Druckanstieg und stärkere Veränderungen des systemischen Blutdrucks sowie des regionalen zerebralen Blutflusses bei größerer Eindringtiefe und höherer Schlaggeschwindigkeit zu beobachten. Goodman und Mitarbeiter verglichen die pathomorphologischen Veränderungen in Bezug zu verschiedenen Traumastärken. Kontusionsvolumen und Zelluntergang in hippokampalen Strukturen korrelierten 14 Tage nach Trauma mit zunehmender Eindringtiefe und höherer Schlaggeschwindigkeit (Goodman et al., 1994).

Die hier vorgestellten Untersuchungen können bestätigen, daß das Controlled Cortical Impact Modell eine exakt kontrollierbare Versuchsdurchführung gewährleistet. Die Veränderung der Parameter Einschlaggeschwindigkeit und Eindringtiefe gewährleistet die Einstellung unterschiedlicher Traumastärken. Das Modell selber stellt durch dessen Aufbau eine technisch aufwendige Methode dar, die bei einmaliger Anschaffung für den eingearbeiteten und exakt arbeitenden Untersucher letztendlich einfach zu bedienen ist und mit wenig Aufwand reproduzierbare Daten liefert.

#### 4.1.6 Narkose

Im Rahmen der Methodendiskussion wird kurz auf die verwendete Narkose der hier vorgestellten Versuche eingegangen. Während in den Vorversuchen eine parenterale Narkose durch Ketamin/Xylazin verwendet wurde, wurde in der Therapiestudie Isofluran über eine Maske den spontan atmenden Tieren zugeführt. Ketamin ist ein schnell wirksames Anaesthetikum, ein Phencyclidinderivat, das den Halluzinogenen nahesteht. Xylazin ist sowohl ein Sedativum, Analgetikum wie auch ein Muskelrelaxanz. Als Cocktail wird diese Kombination häufig in Tierversuchen verwandt. Isofluran ist ein volatiles Anästhetikum, das sich in Form der Masken-Narkose besonders gut eignet, um eine schnelle Narkose-Einleitung und kurze Aufwachphase zu gewährleisten. Die Narkosetiefe ist gut zu steuern.

Die Änderung des Narkoseregimes in Verlauf der hier vorgestellten Untersuchungen ist durch die technische Entwicklung im Rahmen der Etablierung des Trauma-Modells zu verstehen. Aufgrund der Vorteile, die die Isofluran-Narkose bietet, ist die Therapiestudie mit diesem verbesserten Regime durchgeführt worden. Der Vergleich von Blutgasen, MAD, Kontusionsvolumen, Wassergehalt und Hemisphärenschwellung in den Vorversuchen und der Therapiestudie sind nur unter Berücksichtigung der Narkoseform möglich. Er wird hier anhand der Ergebnisse aus der Placebo-Gruppe (Isofluran-Narkose) und den Vorversuchen (Ketamin/Xylazin-Narkose) durchgeführt. Die Blutgasanalyse bestätigt eine suffiziente Ventilation der Tiere der Placebo-Gruppe unter Isofluran Narkose ( $aPO_2$ :  $141,9 \pm 3,0$  mmHg,  $aPCO_2$ :  $33,5 \pm 3,0$  mmHg, pH:  $7,45 \pm 0,02$ ). Im Vergleich dazu sind die Tiere unter Ketamin/Xylazin-Anästhesie bei ebenfalls normwertigen Blutgasen ( $aPO_2$ :  $76,6 \pm 3,2$  mmHg,  $aPCO_2$ :  $41,8 \pm 0,6$  mmHg, pH:  $7,358 \pm 0,02$ ) eher hypoventiliert. Der MAD im Verlauf vor und nach Trauma unterscheidet sich nicht in den beiden Narkose Formen und liegt stets zwischen 75 und 85 mmHg. Das Kontusionsvolumen der Placebo-Gruppe ( $58,89 \pm 9,1$  mm<sup>2</sup>) zeigt keinen signifikanten Unterschied zu den Vorversuchen unter Ketamin/Xylazin-Anästhesie ( $58,62 \pm 7,5$  mm<sup>2</sup>). Demgegenüber ist der Wassergehalt und die Hemisphärenschwellung in den verschiedenen Narkoseformen unterschiedlich. Der Wassergehalt unter Isofluran-Narkose ist sowohl in der kontralateralen Hemisphäre ( $79,46 \pm 0,14$  %) wie auch in der traumatisierten Hemisphäre ( $81,02 \pm 0,14$  %) im Vergleich zu den Ergebnissen der Ketamin/Xylazin-Narkose signifikant niedriger ( $79,98 \pm 0,07$  %;  $82,49 \pm 0,17$  %).

%;  $p < 0,05$ ; ANOVA). Die Hemisphärenschwellung ist ebenfalls in der Isofluran-Gruppe signifikant niedriger ( $9,71 \pm 1,22$  %) im Vergleich zur Schwellung unter Ketamin/Xylazin-Narkose ( $14,3 \pm 1,21$ ;  $p < 0,05$ , ANOVA). Die isolierte Betrachtung des Wassergehalts unter beiden Narkosen zeigt, daß ein Anstieg sowohl in der traumatisierten als auch in der kontralateralen Hemisphäre unter Ketamin/Xylazin-Narkose gegenüber der Isofluran-Narkose zu beobachten ist. Bei Betrachtung des relativen Anstiegs des Wassergehalts in den traumatisierten Hemisphären ist ebenfalls unter Ketamin/Xylazin-Narkose ( $3,14$  %) signifikant höher gegenüber der Isofluran Narkose ( $1,96$  %,  $p < 0,05$ , Student *t*-test). Mills und Mitarbeiter berichten über einen signifikanten Anstieg des Wassergehalts in verschiedenen Hirnarealen unter Ketamin/Xylazin Narkose gegenüber Isofluran Narkose bei gesunden Ratten (Mills et al., 1997). Eine Erhöhung des Wassergehalts beider Hemisphären ist daher am ehesten auf die Narkoseform zurückzuführen. Die Mechanismen, die diese Tatsache erklären könnten, sind nicht bekannt. Ebenso ist der relativ stärkere Anstieg des Wassergehalts in der traumatisierten Hemisphäre unter Ketamin/Xylazin nicht zu erklären.

## 4.2 Hirnödem

Die Definition des Hirnödems nach Pappius ist die Erhöhung des Hirngewebewassergehalts, die zur Erhöhung des Hirngewebevolumens führt (Pappius, 1974). Entsprechend der Monroe-Kellie-Doktrin (Kellie, 1824; Monroe, 1783) führt eine Expansion einer der vier intrakraniellen Kompartimente (Intrazellulärraum, extrazellulärer Gewebeanteil, Blutvolumen und Liquorsystem) zunächst zu einer kompensatorischen Verdrängung eines anderen und im weiteren zu einem intrakraniellen Druckanstieg. Beim Hirnödem entsteht dementsprechend die intrakranielle Volumenzunahme aus der Zunahme des Wassergehalts des Intrazellulärraums oder des extrazellulären Gewebeanteils.

Die Einteilung des Hirnödems erfolgte durch den Neuropathologen Igor Klatzo (Klatzo et al., 1958; Klatzo, 1967). Er unterscheidet zwischen dem sog. "vasogenen" und dem "zytotoxischem" Hirnödem. Beim vasogenen Hirnödem kommt es bei gestörter Integrität der Passagebarriere zwischen Intravasalraum und Hirngewebe, der sog. "Blut-Hirn-Schranke", zum Übertritt von freiem Wasser und Plasmaproteinen in das Hirngewebe. Dadurch kommt es zur Erhöhung des extrazellulären Wassergehalts im Gewebe. Beim zytotoxischen Hirnödem kommt es demgegenüber zu einer Erhöhung des intrazellulären Wassergehalts. Das ist u.a.

bedingt durch direkten Schaden der Zellmembran sowie durch gestörte Regulation des Ionenaustauschs zwischen Intra- und Extrazellulärraum. Im folgenden wird eingehender auf diese Hirnödeme-Typen eingegangen.

#### 4.2.1 *Vasogenes Hirnödem*

Das vasogene Hirnödem ist eine häufige Komplikation bei zerebrovaskulärem Insult, Trauma, Tumoren und inflammatorischen Prozessen. Voraussetzung des vasogenen Hirnödems ist die gestörte Blut-Hirn-Schranke (BHS). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten das anatomische Korrelat der Blut-Hirn-Schranke als ein durch sogenannte "tight junctions" (Membranverschmelzungen im Interzellulärspalt) eng verbundenes, von einer Basalmembran bedecktes und von Astrozytenfortsätzen umlagertes, vaskuläres Endothel. Dieses Endothel besitzt keine transendothelialen Kanäle und keine pinozytische Aktivität (Reese und Karnovsky, 1967). Die BHS stellt eine Passagebarriere zwischen Intravasalraum und Hirngewebe dar. Die Menge der passierenden Substanzen hängt unter physiologischen Bedingungen von der bedingt variablen Permeabilität der BHS und der Kapillaroberfläche ab. Des Weiteren wird die Schrankenpassage von Molekülgröße, Lipidlöslichkeit, Konzentration und Zeit, in der eine Substanz im Plasma enthalten ist, beeinflusst (Bradbury, 1979; Betz et al., 1986).

Die eingehende Untersuchung des vasogenen Hirnödems erfolgte am Modell der kortikalen Kältenekrose (Klatzo et al., 1967). In diesem experimentellen Modell wird der Kortex lokal gefroren. Dadurch entsteht eine zentrale Nekrose, in deren Grenzzone die endotheliale Struktur geschädigt wird und damit die Blut-Hirn-Schranke zusammenbricht. Deshalb wird es als Modell der offenen Blut-Hirn-Schranke charakterisiert. Es treten dabei proteinreiche Exsudate durch die erhöhte Gefäßpermeabilität gegenüber Albumin und anderen Plasmaproteinen aus dem Blut in das Hirngewebe über. Die Dynamik des vasogenen Hirnödems bezogen auf den Fluß des Exsudats aus dem Intravasalraum in das Hirngewebe kann mit der sog. "Starling-Gleichung" veranschaulicht werden (Klatzo, 1994):

$$J_v(\text{Flow}) = L_p [(P_{\text{Plasma}} - P_{\text{Gewebe}}) - \sigma (\Pi_{\text{Plasma}} - \Pi_{\text{Gewebe}})]$$

$J_v$  ist demnach der Fluß zwischen Intravasalraum und Hirngewebe.  $L_p$  ist die hydraulische Leitfähigkeit der endothelialen Membran, die den Permeabilitäts-Status der Blut-Hirn-Schranke widerspiegelt. Diese hängt ab von der Differenz von  $P_{Plasma}$ , dem intravaskulären hydrostatischen Druck, und  $P_{Gewebe}$ , dem im Gewebe gemessenen hydrostatischen Druck. Auf der anderen Seite wird die Entstehung und Erhaltung des Hirnödems von der Differenz des kolloid-osmotischen Drucks von Plasma ( $\Pi_{Plasma}$ ) und Hirngewebe ( $\Pi_{Gewebe}$ ) beeinflusst. Unter physiologischen Bedingungen wird das Gleichgewicht der Wasseraustauschmenge aus Intravasalraum und Hirngewebe durch den hydrostatischen und kolloid-osmotischen Druck bestimmt.

Der hydrostatische Druck des Intravasalraums wird klinisch durch den mittleren arteriellen Blutdruck repräsentiert, während der hydrostatische Gewebedruck näherungsweise durch den intrakraniellen Druck gemessen werden kann. Die Differenz zwischen systemischem Blutdruck und intrakraniell Druck stellt demnach einen bedeutenden Faktor für die Ausdehnung des Hirnödems bei gestörter BHS dar. Klatzo und Mitarbeiter konnten den Einfluß des systemischen arteriellen Blutdrucks auf das Ausmaß des vasogenen Hirnödems bei dem Modell der kortikalen Kältelesion nachweisen (Klatzo et al., 1967).

Der kolloid-osmotische Druck in Intravasalraum und Hirngewebe wird bestimmt durch die Menge der freien Proteine in einer bestimmten Menge Flüssigkeit. Durch die BHS werden freie Plasmaproteine im Intravasalraum zurückgehalten, so daß der kolloid-osmotische Druck eine Verschiebung von freiem Wasser vom Gewebe in das Plasma zur Folge hätte. Da der hydrostatische Druck die Bewegung von freiem Wasser in entgegengesetzter Richtung bewirkt, besteht unter physiologischen Bedingungen eine gegenseitige Regulierung beider Druckgradienten, wodurch der Gewebewassergehalt im Gleichgewicht gehalten wird (Cserr und Patlak, 1991; Rapoport, 1979).

Bei gestörter Blut-Hirn-Schranke geht diese Regulation verloren, woraus die unkontrollierte Entstehung des Hirnödems resultiert. Der bestehende hydrostatische Druckgradient bewirkt den Übertritt von Plasmaproteinen in Verbindung mit Wasser in das Hirngewebe. Der kolloidosmotische Gradient wird dadurch verringert bzw. aufgehoben, da Übertritt von Plasmaproteinen einen Ausgleich der Differenz kolloid-osmotisch wirksamer Proteine bewirkt. Dies hebt die Gegenregulation zum hydrostatischen Druck auf und hat eine vermehrte Ansammlung von Wasser im Gewebe zur Folge (Kimmelberg, 1995). Darüber hinaus wird bei Ausbreitung der proteinreichen Ödemflüssigkeit in Bereiche mit intakter Blut-Hirn-



Schranke der Rückfluß von Plasmaproteinen verhindert. Die Proteine sind hier im Extravasalraum eingeschlossen und erhöhen den kolloid-osmotischen Druck des ungeschädigten Gewebes. In diesen Regionen verringert sich also der kolloid-osmotische Druckgradient, und verhindert den Rückfluß von Wasser zurück in den Intravasalraum. (Klatzo, 1994).

Der Zusammenhang zwischen Extravasation von Plasmaproteinen und der Dynamik des vasogenen Hirnödems ist in einer Reihe von Studien untersucht worden. Durch Verursachen einer erhöhten Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität ohne Schädigung des Hirngewebes konnte gezeigt werden, daß die Konzentration der extravasalen Proteine mit einem Anstieg des Gewebswassergehalts korrelierte (Kuriowa et al., 1985). In einem Modell der direkten Infusion von Ödemflüssigkeit in das Gewebe zeigte Marmarou, daß bei Verwendung von künstlichem Liquor mit niedrigem Proteingehalt für die intraparenchymatöse Infusion eine komplette Rückbildung des Ödems nach 72 h erreicht war. Demgegenüber war bei der Verwendung von Serum als Infusion mit hohem Proteingehalt die Änderung des Wassergehalts in dem gleichen Zeitraum zu vernachlässigen. Demnach ist die Resolution des Hirnödems bei hohem intraparenchymatösen Proteingehalt verzögert (Marmarou et al., 1984; Marmarou et al., 1982). Ebenso zeigte sich ein zeitlicher Zusammenhang zwischen der Reduktion der Plasmaproteinkonzentration im Gewebe und der Reduktion des Gewebswassergehalts auf normale Werte (Klatzo et al., 1980).

Neben dem Einfluß von kolloid-osmotischem und hydrostatischem Druck für die Entstehung und Ausdehnung des vasogenen Hirnödems ist die Bedeutung von Mediatorsubstanzen untersucht worden. *Arachidonsäure* wird z.B. als Mediator des vasogenen Hirnödems angesehen. So bewirkt die Freisetzung von Arachidonsäure eine unspezifische Öffnung der Blut-Hirn-Schranke für nieder- und hochmolekulare Plasmaproteine (Unterberg et al., 1984). Nach Trauma konnten signifikant erhöhte Arachidonsäure-Konzentrationen in der Ödemflüssigkeit nachgewiesen werden. (Staub et al., 1994). Steroide hemmen das an der Entstehung der Arachidonsäure beteiligte Enzym Phospholipase A2. Der therapeutische antiödematöse Effekt von Steroiden wird u.a. durch die verminderte Bildung von Arachidonsäure erklärt. (Hall, 1997).

Die Entstehung von *freien Radikalen* wurde ebenfalls als Ursache des vasogenen Hirnödems diskutiert. Hierfür wird die Oxidation von ungesättigten Fettsäuren des vaskulären Endothels als Ursache angenommen (Hall und Braughler, 1991; Kontos und Povlishock, 1986). Es

wurde gezeigt, daß die zunehmende Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke nach experimenteller kortikaler Kontusion mit einem Anstieg von Hydroxidradikalen verbunden ist (Smith et al., 1994). Der experimentelle Einsatz von Antioxidantien und Lipidperoxidase-Hemmern wie Tirilazad konnte eine Verringerung der Ausdehnung des vasogenen Hirnödems nachweisen (Smith, 1996).

Des weiteren wurde das *Kallikrein-Kinin-Systems*, v.a. sein aktives Polypeptid Bradykinin, als Mediator des vasogenen Hirnödems diskutiert. Bradykinin löst bei direkter extravaskulärer Applikation eine BHS-Störung und eine Ödementstehung aus. Nach kortikaler Kälteläsion konnten Kinine in erhöhter Konzentration im Läsionsfokus und in dem perifokalen Gewebe nachgewiesen werden. Die Hemmung der Kinin-Freisetzung ist mit einer Reduktion des Hirnödems verbunden (Unterberg et al., 1984). Auch wird die Bedeutung von biogenen Aminen wie Serotonin und Histamin für die Entstehung des vasogenen Hirnödems diskutiert (Wahl et al., 1988).

#### 4.2.2 Zytotoxisches Hirnödem

Klatzo definierte das zytotoxische Hirnödem als Schwellung des Intrazellulärraums mit gleichzeitiger Abnahme des Extrazellulärraumvolumens bei intakter endothelialer Zellstruktur der Blut-Hirn-Schranke (Klatzo, 1967). Der Ursprung des Begriffs "zytotoxisch" ist darauf zurückzuführen, daß Klatzo erstmals den Zustand der intrazellulär lokalisierten Wassereinlagerung mittels einer toxischen Substanz (Triethyl-Zinn) auslösen konnte. Charakteristisch ist die Volumenzunahme der intrazellulären Strukturen, weshalb es auch als zelluläres Ödem bezeichnet wird. Der Zustand des zellulären Ödems wird nach zerebraler Ischämie, Hypoxie oder Trauma beobachtet. Zellschwellung muß als akute Reaktion auf ein pathologisches Ereignis verstanden werden, welches in den ersten drei Stunden bis zu drei Tagen nach Trauma gesehen wurde (Bullock et al., 1991). Primär handelt es sich dabei um eine physiologische Antwort auf die entsprechende Noxe und wird erst bei Dekompensation endogener Schutzmechnismen zellschädigend (Kempski und Volk, 1994). An der Entstehung des zytotoxischen Ödems sind neben Neuronen vor allem auch die Astrozyten entscheidend beteiligt (Bullock et al., 1991; Kimelberg und Ransom, 1986) Die Astrozyten erscheinen morphologisch in der akuten Phase nach Trauma als vergrößerte und zytoplasmatisch blasse Zellen mit verminderter Dichte.

Für die Entstehung des zellulären Ödems werden drei Mechanismen verantwortlich gemacht (Baethmann et al., 1988):

1. Erhöhte Permeabilität der Zellmembran für Natrium mit konsekutivem  $\text{Na}^+$ -Einstrom
2. Dysfunktion der ATP-abhängigen Natrium/Kalium-Pumpe
3. Aufhebung des Membranpotentials gefolgt von Funktionsverlust der aktiven Ionen-Pumpen.

Es wird vermutet, daß Natrium aufgrund seiner osmotischen Wirkung bei der Entstehung des zellulären Ödems eine zentrale Rolle spielt. Vereinfacht kann die Ödementstehung an dem gestörten Gleichgewicht der intra-/extrazellulären Natrium-Konzentration beschrieben werden. Unter physiologischen Bedingungen wird der Einstrom von  $\text{Na}^+$ -Ionen ausgeglichen, indem energieabhängige Pumpen (z.B.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe) durch den nach extrazellulär verlaufenden Transport von  $\text{Na}^+$ -Ionen das Gleichgewicht gewährleisten. Diese erhalten das Membran-Potential und vermeiden die intrazelluläre Anhäufung von osmotisch aktiven Substanzen, die einen sekundären Einstrom von Wassermolekülen zur Folge hätten. Unter pathologischen Bedingungen ist die Permeabilität der Zellmembran gegenüber  $\text{Na}^+$ -Ionen unkontrolliert. Das hat einen  $\text{Na}^+$ -Einstrom zur Folge. Das Energiedefizit, welches häufig bei Ischämie oder Trauma durch mangelnde Gewebepерfusion entsteht, verhindert den Einsatz energieabhängiger Pumpen. Dadurch bleibt die intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Ionen Konzentration erhöht und verursacht durch den erhöhten intrazellulären osmotischen Druck den Einstrom von Wassermolekülen und damit die Zellschwellung (Baethmann und Kempfski, 1997).

Für die erhöhte  $\text{Na}^+$ -Permeabilität werden verschiedene Mechanismen verantwortlich gemacht. Zunächst ist die posttraumatische Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren wie Glutamat und Aspartat von besonderer Bedeutung (Baethmann et al., 1989; Choi, 1992; Kempfski et al., 1988; Kimelberg, 1995; Schneider et al., 1992). Die posttraumatisch erhöhte Konzentration von Glutamat im Extrazellulärraum (Palmer et al., 1993; Stover et al., 1999) verursacht Kopplung an den Glutamatrezeptor die Öffnung von  $\text{Na}^+$ -Kanälen mit konsekutivem  $\text{Na}^+$ -Einstrom.

Des weiteren nehmen Astrozyten ihre Clearance-Rolle gegenüber den extrazellulär überschüssigen Aminosäuren wahr. Dabei ist der aktive Transport von einem Glutamat-Molekül mit dem Einstrom von 2-3  $\text{Na}^+$ -Ionen verbunden, wodurch ebenfalls die intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration und damit dessen osmotische Wirksamkeit gegenüber

extrazellulärem Wasser erhöht wird. Dieser Prozeß ist einerseits als ein kompensatorischer Mechanismus zu verstehen, andererseits trägt er jedoch zur Verstärkung des zellulären Ödems bei.

Auch die posttraumatisch vermehrt generierten freien Radikale werden als Ursache für eine direkte Membranschädigung diskutiert. Die durch freie Radikale verursachte Lipidperoxidation generiert neue freie Radikale und bewirkt eine unspezifische Schädigung der zellulären Membran (Hall, 1997). Es ist gezeigt worden, daß die Bildung von freien Radikalen im Rahmen von Trauma und Ischämie v.a. nach einer Reperfusionsphase erfolgt (Anderson und Hall, 1994; Smith et al., 1994). Nach solcher Reperfusion ist ein generalisierter Zusammenbruch der Membran-Permeabilität zu vermuten. Die dabei beobachtete ausgeprägte generalisierte Zellschwellung wäre dadurch zu erklären.

Ebenso erhöht die durch Sauerstoffmangel vermehrt aktivierte Glykolyse die intrazelluläre Konzentration von Laktat, die mit einem erniedrigten pH-Wert einhergeht (Staub et al., 1994). Als zellulärer Kompensationsmechanismus dient der Austausch von Protonen ( $H^+$ ) gegen Natrium ( $H^+/Na^+$ -Pumpe). Das führt zu erneuter intrazellulärer Anreicherung von Natrium und wiederum zur Zellschwellung (Staub et al., 1996).

Das zytotoxische Ödem stellt einen Faktor des sekundären Hirnschadens nach Trauma, Ischämie oder Hypoxie dar. Es ist ein Zeichen der Zellschädigung und ggf. Ursache einer sekundären intrakraniellen Drucksteigerung. Im folgenden wird das posttraumatische Hirnödem beim Controlled Cortical Impact Injury anhand der in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen charakterisiert.

#### 4.2.3 *Hirnödem beim Controlled Cortical Impact Injury*

Die vorliegenden Untersuchungen weisen die Existenz eines posttraumatischen Hirnödems verursacht durch das Controlled Cortical Impact Injury nach. Der Anstieg des Wassergehaltes betrug 24 Stunden nach Trauma 2,6 % auf der traumatisierten linken Hemisphäre gegenüber der nicht traumatisierten rechten Hemisphäre. Die nicht-traumatisierte rechte Hemisphäre bleibt von der Ausbreitung des Hirnödems weitgehend verschont. Die Hemisphärenschwellung beträgt 14,3% nach Trauma durch CCII.

Die Extravasation von Evans Blue nach CCII weist die pathologische endotheliale Permeabilität von Plasmaproteinen in der Größenordnung von Albumin nach. Dadurch wird ein BHS-Schaden und die vasogene Komponente der traumatischen Läsion bewiesen.

Der Nachweis der zytotoxischen (zellulären) Ödemkomponente kann anhand der vorliegenden Untersuchungen nur indirekt geführt werden. Dafür wird der Vergleich mit dem Modell der kortikalen Kälteläsion herangezogen. So konnten Unterberg und Mitarbeiter nach Kältenekrose des Rattenkortex eine posttraumatische Schwellung von  $6,9 \pm 0,05$  % und einen Anstieg des Wassergehalts der traumatisierten Hemisphäre gegenüber der kontralateralen nicht geschädigten Hemisphäre von 1,5 % nachweisen. In der gleichen Serie wurde eine Extravasation von Evans Blue in der traumatisierten Hemisphäre von  $107,8 \pm 10$  ng/mg TG gefunden (Unterberg et al., 1994). Im Vergleich dieser Daten mit den Werten der vorliegenden Untersuchungen findet sich bei deutlich stärkerer Schwellung und gleichzeitig höherem Anstieg des Wassergehalts ein deutlich geringerer Anteil von Evans Blue-Extravasation. Daraus folgt, daß das vasogene Hirnödem an der Entstehung des gesamten Ödems nach CCII in geringerem Ausmaß beteiligt ist und daß das zytotoxische Ödem eine größere Bedeutung besitzen muß. Es wurde gezeigt und oben diskutiert, daß es sich bei dem Modell der Kälteläsion in erster Linie um ein Modell des vasogenen Hirnödems handelt. Beim Controlled Cortical Impact Injury ist davon auszugehen, daß die zytotoxische Ödemkomponente eine mindestens ebenso starke Bedeutung bei der Entstehung des gesamten posttraumatischen Hirnödems hat wie die vasogene Komponente.

Diese Überlegungen werden durch die Magnetresonanztomographie (MRT) nach Controlled Cortical Impact Injury unterstützt. Es wird angenommen, daß durch die sog. "diffusionsgewichtete MRT" (DWI) der Anteil des zytotoxischen Hirnödems nachgewiesen werden kann. Hierbei wird die molekulare Bewegung von Wasser gemessen und in Form des sog. "apparent water diffusion coefficient" (ADC) wiedergegeben. Der ADC gibt die Bewegungsfreiheit von Wassermolekülen in den gemessenen Arealen an. Dadurch kann anhand eines niedrigem ADC v.a. auf die intrazelluläre Lokalisation von Wassermolekülen und damit auf das zytotoxische Hirnödem geschlossen werden. Demgegenüber bestimmt ein hoher ADC-Wert Areale mit eher extrazellulärem Wasseranteil, also das vasogene Hirnödem. Diese Methode wurde anhand der Klatzo-Modelle des vasogenen (Kälteläsion) und des zytotoxischen Ödems (Triethyl-Zinn) geprüft, wobei nachgewiesen werden konnte, daß sich die beiden Hirnödemyten mittels ADC Bestimmung voneinander unterscheiden ließen

(Ebisu et al., 1993). Beim posttraumatischen Schaden nach Controlled Cortical Impact Injury konnte mittels des DWI im zentralen Bereich der Kontusion ein erniedrigter ADC gemessen werden und damit die Existenz eines zytotoxischen Ödems nachgewiesen werden (Stroop et al., 1998).

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zum posttraumatischen Hirnödem nach CCII beschäftigten sich mit der zeitlichen Dynamik des Ödems und dessen therapeutischer Beeinflussung. Baskaya und Mitarbeiter (Baskaya et al., 1997) beschrieben einen biphasischen Verlauf der posttraumatischen Permeabilität gegenüber Evans Blue. Dabei wird eine maximale Extravasation von Evans Blue 6 Stunden nach Trauma gemessen. Ein zweiter Anstieg von extravasal diffundiertem Evans Blue ist drei Tage nach Trauma nachgewiesen worden. Anhand der Bestimmung des spezifischen Gewichts des Hirngewebes, wurde die stärkste Ödemausbildung 24 Stunden nach Trauma festgestellt. Das deckt sich mit den Untersuchungen von Duvdevani und Mitarbeitern (Duvdevani et al., 1995). Sie untersuchten den zeitlichen Verlauf des vasogenen Hirnödems und des absoluten Wassergehalts. Hierbei wird der höchste Wassergehalt ebenfalls nach 24 Stunden beschrieben. Die Extravasation von Evans Blue ist am dritten Tag nach Trauma maximal.

Eine Reihe von Substanzen sind in der Lage, die Entstehung des posttraumatischen Ödems nach CCII zu reduzieren. Die Behandlung mit dem nicht-kompetitiven Glutamat-Rezeptor-Antagonisten Cerestat und mit den Antioxidantien und Radikalfängern Melatonin und OPC-14117 bewirkt eine Reduktion des posttraumatischen Hirnödems (Kawamata et al., 1997; Kroppenstedt et al., 1998; Sarrafzadeh et al., 1997). Die vasogene Ödemkomponente konnte durch die Hypothermie und antioxidative Substanzen wie Tirilazad reduziert werden (Smith, 1996; Smith et al., 1994).

#### 4.3 *Ödemresolution*

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ermöglichen den morphologischen Nachweis von extravasalem Evans Blue nach posttraumatisch gestörter Blut-Hirn-Schranke. In den hier vorgestellten Untersuchungen ist die Lokalisation von Evans Blue in drei Bereiche zu unterteilen: 1. im Extrazellulärraum, 2. in zellulären Elementen und 3. in perivaskulären Arealen. Diese Verteilung entspricht auch der nach kortikaler Kälteläsion gefundene

Anreicherung von Evans Blue in den parenchymatösen Strukturen (Vorbrodt et al., 1985). Diese Beobachtungen lassen sich wie folgt interpretieren:

Zum einen ist die Existenz eines vasogenen Hirnödems durch den extravasalen Nachweis von Evans Blue nach Controlled Cortical Impact Injury bestätigt. Zum anderen können anhand der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen Aussagen über die morphologische Verteilung des vasogenen Hirnödems getroffen werden. Es ist gezeigt worden, daß ein direkter Zusammenhang zwischen den extravasal nachgewiesenen Proteinen wie Albumin und der Ausdehnung des vasogenen Hirnödems besteht (Kuroiwa et al., 1985; Marmarou et al., 1984). Das hier gezeigte Verteilungsmuster zeigt einen zentralen Bereich der Kontusion, in der keine Evans Blue Extravasation nachweisbar ist. Hierbei handelt es sich am ehesten um ein sekundär ischämisches Areal, in der das Evans Blue bei gestörter Mikrozirkulation nicht den Intravasalraum erreicht (Bryan et al., 1995). Im perifokalen Areal ist sichtbar die Blut-Hirn-Schranke gestört, so daß hier der deutliche Nachweis der Extravasation gegeben ist.

Desweiteren ist die Ausdehnung und strukturelle Verteilung der Plasmaproteine indirekter Hinweis für die intraparenchymatöse Auflösung des vasogenen Hirnödems. Ohata und Marmarou unterscheiden anhand des extravasalen Verhaltens verschiedener Plasmaproteine bei gestörter BHS drei Mechanismen der Ödemauflösung (Ohata et al., 1990):

*Erstens* findet ein vom Parenchyndruck abhängiger Massenstrom (bulk flow) in Richtung der Liquorräume (Subarachnoidalraum und Ventrikel) statt (Ohata et al., 1990; Reulen et al., 1978). Dabei werden zwei Phasen unterschieden: in der ersten Phase bewirkt der kolloidosmotische Druckgradient eine gesteuerte Massenbewegung in Richtung der Ventrikel und des Subarachnoidalraums. Dieser verläuft über den Extrazellulärraum des Neuropils, der erweiterten Perikapillärräume und Perivaskulärräume. In der zweiten Phase, in der der kolloidosmotische Druckgradient im Gewebe ausgeglichen ist, erfolgt der Strom durch physiologisch ablaufende intraparenchymatöse Liquorzirkulation v.a. entlang der Venolen und Venen. Dieser Mechanismus wird als physiologisch betrachtet. Sowohl bei Injektion von proteinreichem Plasma in das Hirngewebe (Ohata et al., 1990) als auch bei einem Ratten-Modell mit vorübergehender Öffnung der Blut-Hirn-Schranke durch Hochdruckinfusion von Eigenblut (Kuriowa et al., 1985) verlief der Abtransport von Plasmaproteinen ausschließlich über diesen Mechanismus.

*Zweitens* ist bei dem durch kortikale Kälteläsion ausgelöstem vasogenen Hirnödem eine zelluläre Aufnahme der Plasmaproteine beschrieben. Diese betrifft sowohl Neurone, Astrozyten als auch Mikroglia (Klatzo et al., 1980; Tengvar und Olsson, 1982). Zwei Formen der zellulären Aufnahme von Plasmaproteinen in Neurone wird von Tengvar und Olsson unterschieden: die diffuse und die granuläre neuronale Aufnahme von Plasmaproteinen. Während sich die Form der diffusen Aufnahme von Plasmaproteinen nur im Zentrum der Kälteläsion beobachten läßt, ist die granuläre Aufnahme vornehmlich in benachbarten Arealen zum Läsionsfokus zu finden. Die diffuse Aufnahme wird auf die direkte Durchlässigkeit in das Neuron bei geschädigter Membranstruktur zurückgeführt. Demgegenüber wird die granuläre Form durch eine axonalen Aufnahme der Proteine und lysosomalen Transport in den Zellkörper erklärt (Tengvar und Olsson, 1982).

*Drittens* wird vermutet, daß der Abtransport der extravasalen Plasmaproteine über einen retrograd verlaufenden, vesikulären Transport der Endothelzellen zurück in das Gefäßlumen erfolgt (Vorbodt et al., 1985). Die beiden zuletzt genannten Wege zur Normalisierung des Gewebswassergehalts und des Abtransports der extravasalen Plasmaproteine sind nur in Zusammenhang mit geschädigtem Hirngewebe nachweisbar. Der retrograde vesikuläre Transport durch die Endothelzellen ist v.a. die physiologische Regulation des Gewebsplasma- und Gewebswassergehalts.

Die Untersuchungen dieser Arbeit geben einen Überblick über die strukturelle Verteilung der Extravasation von Evans Blue nach CCII und zeigen, daß die Verteilung dem entspricht, wie sie beim vasogenen Hirnödem nach kortikaler Kälteläsion beschrieben wurde. In Bezug auf die erwähnten Resolutions-Mechanismen der Plasmaproteine bzw. der Ödemflüssigkeit zeigen die Untersuchungen eine entsprechende Verteilung im Extrazellulärraum, in perivaskulären Arealen, zellulären Strukturen und Axonen.

#### 4.4 Pathomorphologie

##### 4.4.1 Kontusionsvolumen

Die Bestimmung des Kontusionsvolumens erfolgte in der vorliegenden Untersuchung anhand der 2-,3-,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Färbung. Die Methode wurde am Herzmuskel zur Identifikation von ischämischen Arealen etabliert (Sandritter und Jestadt, 1958). TTC



dient als Protonenakzeptor gegenüber Pyridinnukleotid-Enzym-Systemen. Zu ihnen zählen die mitochondrialen Dehydrogenasen, die mit Cytochromen den Teil der inneren Mitochondrienmembran bilden und den Elektronentransport gewährleisten (Glenner, 1969). Die Dehydrogenasen reduzieren das Tetrazoliumsalz zu Formazan, welches eine intensive rote Färbung annimmt. In kontusioniertem Gewebe, in dem die Aktivität der Dehydrogenasen aufgrund des Energiedefizits reduziert ist, erfolgt keine Anfärbung. Somit kann es gut von gesundem Gewebe abgegrenzt werden.

Das Kontusionsvolumen wurde anhand der TTC Färbung mit  $56,7 \pm 19,2 \text{ mm}^3$  bestimmt. Im Vergleich der Literatur sind ähnliche Ergebnisse zu finden. Sutton quantifizierte das Kontusionsvolumen anhand der Nisslfärbung bei der Eindringtiefe von 2 mm und einer Schlaggeschwindigkeit von 3,22 m/s mit knapp  $50 \text{ mm}^3$  24 Stunden nach Trauma (Sutton et al., 1993). Im eigenen Labor bei gleichem Versuchstyp fand Kroppenstedt mit der HE-Färbung Kontusionsvolumina von  $77,3 \pm 2,1 \text{ mm}^3$  (Kroppenstedt et al., 1998),  $50,0 \pm 3 \text{ mm}^3$  (Kroppenstedt et al., 1999a) und  $50,0 \pm 4 \text{ mm}^3$  (Kroppenstedt et al., 1999b). Sarrafzadeh bestimmt Kontusionsvolumina von  $59,5 \pm 5,7 \text{ mm}^3$  in der HE-Färbung und  $67 \pm 5 \text{ mm}^3$  in der TTC-Färbung (Sarrafzadeh et al., 1997). In der oben beschriebenen Bay X 3702-Studie ergab sich mit der Nissl-Färbung ein Kontusionsvolumen in der Kontrollgruppe von  $57,8 \pm 8 \text{ mm}^3$ . Die meisten dieser Ergebnisse liegen eng beieinander. Dennoch sind Vergleiche zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen aufgrund der technisch unterschiedlichen Handhabung des Modells nur begrenzt möglich.

#### 4.4.2 Zelluntergang

Am Zelluntergang sollen primäre und sekundäre Mechanismen beteiligt sein. Man unterscheidet als verschiedene Formen des neuronalen Todes: die *Nekrose* und die *Apoptose*.

Die *Nekrose* ist ein durch äußere Stimuli hervorgerufener primärer oder sekundärer Zellschaden, der zum Zelluntergang führt. Als primäre Ursache nach zerebralem Trauma ist die mechanische Einwirkung auf das Hirngewebe zu verstehen, die zu einem direkten Untergang von Neuronen führt. Diesen Untergang bezeichnet man als sog. "Mechanoporation" (Graham und Gennarelli, 1997). Über die Größe dieses Anteils am gesamten traumatischen Gewebsschaden besteht Uneinigkeit. Maxwell und Povlishock postulierten, daß der unmittelbare Untergang von Neuronen und Schaden an Axonen eher

ungewöhnlich ist (Maxwell et al., 1991; Maxwell et al., 1993; Povlishock, 1992). Stärkere Bedeutung soll der sekundäre Zellschaden haben. Er entwickelt sich in Minuten, Stunden bis Tagen nach dem Traumaereignis. Die Ursachen für den progressiven Zelluntergang sind mechanischer, hämodynamischer, respiratorischer und metabolischer Art. Sutton und Mitarbeiter haben eine Progression nach Controlled Cortical Impact Injury nachweisen können (Sutton et al., 1993). Im Verlauf von 30 Tagen ist ein kontinuierlicher Zuwachs des Kontusionsvolumens von ca. 15 mm<sup>3</sup> (6 Std.) auf 50 mm<sup>3</sup> (30 Tage nach Trauma) gezeigt worden. Es ist jedoch nicht bekannt, wie groß der Anteil des sekundären Zellschadens ist, der reversibel ist und damit therapeutisch zugänglich bleibt.

Die *Nekrose* ist morphologisch gekennzeichnet durch Veränderungen der Kernstruktur und des Zytoplasmas. Die morphologischen Kernveränderungen werden als Karyolyse, Pyknose und Karyorrhexis bezeichnet. Veränderungen des Zytoplasmas beinhalten Eosinophilie (Azidophilie), Strukturverlust und Fragmentation. Die Zelle erscheint in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung zunächst leicht geschrumpft, das Zytoplasma eosinophil und der Zellkern ist dunkel und oft dreieckig geformt. Das eosinophile Zytoplasma wird im Verlauf strukturlos und verliert an Volumen. Der Kern schrumpft weiter, so daß zuletzt nur noch eine zerklümmte Kernstruktur ohne Zytoplasma erkennbar ist (Kreutzberg et al., 1997). Diese Merkmale weisen eher auf einen irreversiblen Untergang von Neuronen hin und sind stets mit einem Abbau aus dem Zellverband mit Hilfe von Makrophagen verbunden (Auer et al., 1985a; Auer et al., 1985b). Den lichtmikroskopischen Veränderungen liegen ultrastrukturelle Veränderungen zu Grunde. Dazu zählen Auflösungen von Ribosomen, Zusammenbruch des Zytoskeletts, Verdichtung und Schrumpfung der Mitochondrien, Unterbrechungen der Kern- und Zellmembran sowie biochemische Alterationen wie eine gestörte Proteinsynthese (Auer et al., 1985b; Auer et al., 1985c). Spezifisch für die Nekrose ist, daß es sich um Verbände betroffener Zellen handelt und nicht, wie bei der Apoptose, um einzelne Zelluntergänge.

Von der Nekrose müssen morphologische Veränderungen abgegrenzt werden, die eine reine hell-dunkel-Alteration der Zellstruktur darstellen. In den sog. "dark neurons" zeigen sich ultrastrukturell Kondensationen des Zytoplasmas und der Kernstruktur. Diese sind jedoch reversible Veränderungen. Serielle Untersuchungen haben gezeigt, daß diese Zellen überleben und völlig regenerieren können (Auer et al., 1985a).

Die Ursachen der Nekrose sind bis heute nicht vollends geklärt. Verschiedene Mechanismen werden als Auslöser für den irreversiblen Untergang von Zellen verantwortlich gemacht. Als

eine mechanische Ursache wird seit kurzem der Vorgang der sogenannten "Mechanoporation" diskutiert. Auslöser dieser Schädigung ist der durch das mechanische Trauma ausgelöste Defekt der zweischichtigen Phospholipidstruktur der zellulären Membran. Die dabei entstehende Lösung der Membranstruktur von den stabileren Proteinstrukturen, wie z.B. der Elektronenkanäle, verursacht einen unkontrollierten Austausch zwischen Extra- und Intrazellulärraum, v.a. von Elektrolyten, was den Zusammenbruch des Membranpotentials verursacht und schließlich den Zelltod zur Folge hat (Graham und Gennarelli, 1997).

Im Rahmen der sekundären Zellschädigung werden eine Reihe von *Mediatorsubstanzen* für die Entstehung des Zelluntergangs mitverantwortlich gemacht. Die Bedeutung der exzitatorischen Neurotransmitter als Mediatoren des sekundären Zellschadens ist dabei häufig diskutiert worden. Die Rolle der exzitatorischen Aminosäure *Glutamat* ist wohl am besten untersucht worden. So wurde Glutamat nach CCII-Trauma in erhöhter Konzentration im Gewebe und im Liquor nachgewiesen (Palmer et al., 1993). Es scheint gesichert, daß es nach Glutamat-Freisetzung zu einer unkontrollierten Aktivierung von verschiedenen Rezeptoren kommt. Als Glutamat-Rezeptoren sind der NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat), der AMPA- ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionat) und der Quisqualat-Rezeptor in den letzten Jahren identifiziert worden. Durch deren Aktivierung werden vermutlich intrazelluläre Mechanismen ausgelöst, die zum Zelltod führen. Durch die Blockierung dieser Rezeptoren konnte mehrfach eine Reduktion des posttraumatischen Hirnschadens in verschiedenen experimentellen Trauma-Modellen nachgewiesen werden (Kroppenstedt et al., 1998; Shapira et al., 1990; Shohami et al., 1993). Zu den Mechanismen der sekundären Zellschädigung durch Aktivierung der einzelnen Rezeptoren werden folgende Überlegungen angestellt:

Der NMDA Rezeptor besitzt einen spannungsabhängigen Ionenkanal. Bei Bindung von Glutamat kommt es zur Öffnung des Ionenkanals. Die spannungsabhängige Blockierung durch  $Mg^{2+}$ , das den Kanal verschließt, wird durch eine Depolarisation des Neurons aufgehoben. So wird der Einstrom von  $Ca^{2+}$  und  $Na^{+}$  sowie der Ausstrom von  $K^{+}$  ermöglicht (Fields et al., 1991; Jahr und Stevens, 1990). Eine Modulation dieses Systems erfolgt durch Glyzin,  $Zn^{2+}$  und verschiedene Polyamine. Der unkontrollierte Einstrom von  $Na^{+}$  und  $Ca^{2+}$  bei Öffnung des Kanals durch Glutamat spielt die zentrale Rolle für die daraus folgende Zellschädigung. Während  $Na^{+}$  bei der Entstehung des zytotoxischen Ödems eine entscheidende Rolle spielt, nimmt  $Ca^{2+}$  bei der direkten sekundären Zellschädigung die Schlüsselfunktion ein (s.u.).

Im weiteren sind die sog. "nicht-NMDA"-Rezeptoren AMPA und Quisqualat für den sekundären Zelluntergang von Bedeutung. Der AMPA-Rezeptor ist mit einem monovalenten Kationenkanal assoziiert. Seine Aktivierung, die nicht spannungsabhängig ist, bewirkt den Einstrom von  $\text{Na}^+$  und den Ausstrom von  $\text{K}^+$  (Foster und Fagg, 1987; Young und Fagg, 1990). Dies bewirkt unter anderem die Depolarisation der Zelle, die zur Deblockierung des NMDA-Rezeptors durch  $\text{Mg}^{2+}$  notwendig ist. Untersuchungen von Iino und Mitarbeitern haben ebenfalls die Durchlässigkeit des Rezeptorkanals für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen postuliert (Iino et al., 1990). Das dritte System ist der Quisqualat-Rezeptor. Er ist ein nicht selektiver metabotroper Rezeptor mit einem second-messenger-System. Die Bindung von Glutamat an diesem Rezeptor bewirkt die Aktivierung von Phospholipase C über ein G-Protein. Dieses bewirkt indirekt über die Produktion von Inositoltriphosphat (IP3) die Freisetzung von intrazellulär gebundenem  $\text{Ca}^{2+}$ .

*Kalzium-Ionen* besitzen eine zentrale Rolle bei der intrazellulär ablaufenden sekundären Schädigung von Neuronen nach Trauma oder Ischämie. Die Freisetzung von intrazellulärem Kalzium wird häufig auch als der letzte Schritt für den einsetzenden Zelltod bezeichnet. Kalzium gilt als vielfältiger Mediator verschiedener Prozesse, die die Autodigestion der Zelle einleiten bzw. bewirken. So aktivieren  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen intrazelluläre Enzyme, die Proteine, Lipide und Nukleinsäuren auflösen. Aktivierte Proteasen führen zur Zerstörung von funktionellen (ATPase, Superoxiddismutase) und strukturellen (Neurofilament, Myelin) Proteinen (Banik et al., 1985; Faden et al., 1987; Pant und Gainer, 1980; Seddick und Habib, 1991). Aktivierte Phospholipasen spalten Membran-Phospholipide, wobei Arachidonsäure freigesetzt wird, aus denen sich wiederum vasoaktive und inflammatorische Prostaglandine und Leukotriene bilden (D'Avella et al., 1990; Young, 1992). Aktivierte Nukleasen führen zur direkten Schädigung zellulärer DNA, die einen programmierten Zelltod (Apoptose) zur Folge haben kann (Joseph et al., 1993; Pittman et al., 1993). Darüber hinaus unterhält Kalzium in Zusammenhang mit freien Radikalen die Aufrechterhaltung der membranzerstörenden Lipidperoxidation (Hall, 1997).

Als weiterer Mediator des sekundären Hirnschadens werden *freie Radikale* diskutiert. Die posttraumatische Entstehung von Hydroxylradikalen konnte nach Controlled Cortical Impact Injury nachgewiesen werden. Der vorübergehende Anstieg erreichte den Höchstwert 5-15 Minuten nach Trauma (Smith et al., 1994). Demgegenüber wurde ein kontinuierlicher Anstieg der Lipidperoxidation innerhalb der ersten Stunde nach Trauma gemessen (Smith et al., 1994).

In experimentellen Studien können Antioxidantien und Radikalfänger, wie u.a. Melatonin und Tirilazad, das Kontusionsvolumen verringern und das neurologische Outcome der Versuchstiere verbessern (Kawamata et al., 1997; Sarrafzadeh et al., 1997; Smith et al., 1994). Eine große Bedeutung unter den freien Radikalen hat vermutlich das Radikal Superoxid ( $O_2^{\bullet-}$ ). Man geht davon aus, daß sich an dessen Entstehung eine Reihe von weiteren Mechanismen anschließt, die die Lipidperoxidation aufrechterhalten. Für die Entstehung der freien Radikale nach SHT werden verschiedene Ursachen diskutiert. Sie beinhalten die Arachidonsäure-Kaskade (Prostaglandin-Synthetase, 5-Lipoxygenase-Aktivität), enzymatische Autooxidation von biogenen Aminen (Dopamin, Noradrenalin, Serotonin), Xanthin-Oxidase-Aktivität und die Oxidation nach extravasal übergetretenen Hämoglobins. Aktivierte Mikroglia, Endothelzellen, infiltrierte neutrophile Granulozyten und Makrophagen können ebenfalls an der Entstehung von freien Radikalen beteiligt sein (Hall, 1997). Neben Superoxid ist auch auf die Bedeutung von Stickoxyl Radikalen ( $NO^{\bullet}$ ) hingewiesen worden (Radi et al., 1991). Beide sind an der Entstehung des reaktionsfreudigeren Hydroxyl-Radikals ( $OH^{\bullet}$ ) beteiligt, das als direkter Initiator der Lipidperoxidation gilt. Hydroxyl-Radikale und die Membran-Lipidperoxidation verursachen bzw. unterstützen im Rahmen des sekundären Hirnschadens den Verlust der Autoregulation, den Blut-Hirn-Schranken-Schaden, die anterograde axonale Degeneration und die direkte Schädigung zellulärer Membranen (Hall, 1997).

Bei den beschriebenen Vorgängen des Zelluntergangs verursachenden sekundären Mechanismen handelt es sich nicht um getrennt ablaufende Kaskaden der einzelnen Mediatorsysteme. Vielmehr sind es komplexe, sich gegenseitig beeinflussende Prozesse, die den progressiven Untergang des Hirngewebes bewirken. So kann die Entstehung von freien Radikalen die Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren bewirken oder die Freisetzung von Glutamat die Produktion von Hydroxyl-Radikalen verursachen. Darüber hinaus verursachen einige Mechanismen, die an der Entstehung von freien Radikalen beteiligt sind, die Freisetzung von intrazellulärem  $Ca^{2+}$ , wie z.B. die Arachidonsäure-Kaskade, enzymatische Oxidationen und Xanthin-Oxidase-Aktivierung. Ebenso verstärkt der intrazelluläre Kalzium-Überschuß die Radikal-induzierte Lipidperoxidation, die wiederum eine intrazelluläre Kalziumüberladung verursacht (Hall, 1997).

Die hier vorgestellten morphologischen Untersuchungen zeigen die verschiedenen Stadien der Nekrose in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (siehe Ergebnisteil Histologie). Im Zentrum der Kontusion findet sich 24 Stunden nach CCII ein ausgedehnter Zelluntergang. Hier finden sich wenige Neuronen-ähnliche Strukturen. In den Randbezirken finden sich die nekrosetypischen Zeichen in den geschädigten Neuronen wieder: eosinophiles Zytoplasma, pyknotische und verklumpte Zellkerne sowie aufgelöste zytoplasmatische Strukturen. Es finden sich ebenfalls untypische Zellstrukturen im Vergleich zu den beschriebenen Nekrose-Merkmalen. Im Bereich des Kontusionszentrums befinden sich Areale mit sog. "eosinophilen Schatten" (Abb. 3.14.c). Das Zytoplasma ist zwar eosinophil und kaum strukturiert, die Zellkerne jedoch nicht wie erwartet pyknotisch verändert, sondern geschwollen und ebenfalls eosinophil gefärbt. Hier läßt sich vermuten, daß es sich um die morphologische Erscheinungsform nach Mechanoporation handelt (Graham und Gennarelli, 1997).

Sutton und Mitarbeiter untersuchten ebenfalls die neuronalen Veränderungen des posttraumatischen Hirnschadens nach Controlled Cortical Impact Injury. Sie beschreiben zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Trauma ähnliche Nekrose-typische Zellveränderungen. Ein zentrales Areal von komplettem Zelluntergang, eine Randzone mit pyknotisch veränderten Neuronen eingebettet in ödematös aufgeschwemmtem Extrazellulärraum und ein fließender Übergang in den gesunden Anteil von Hirngewebe-Strukturen wird dort beschrieben. Diese Dreigliederung kann durch die hier vorgestellten Untersuchung bestätigt werden (Sutton et al., 1993).

Die *Apoptose* ist eine Form des Zelluntergangs, die durch intrazelluläre Mechanismen gesteuert wird. Sie kann spontan oder durch eine exogene Ursache ausgelöst werden. Die Bezeichnung Apoptose leitet sich aus dem Griechischen ab (apo - "von", ptosis - "der Fall") und verwendet das Bild eines vom Baum fallenden Blattes als determinierter Vorgang des Absterbens. Man spricht auch von dem programmierten Zelltod. Die Apoptose ist durch eine Veränderung in der Morphologie der Kernstruktur gekennzeichnet (Kerr et al., 1972). Diese läuft in verschiedenen Stadien ab, welche zunächst durch die Entwicklung von Pseudopodien der Kernmembran gekennzeichnet ist (Zeiosis). Daraufhin entsteht eine Fragmentation der DNA, die durch Kondensation des Kern-Chromatins entsteht und die für die Apoptose typischen sog. "apoptotic bodies" bildet. Im Unterschied zur Nekrose erkennt man im Zytoplasma eine Schwellung der Mitochondrien. Außerdem ist für die Apoptose typisch, daß sie nicht in Zellverbänden abläuft, sondern nur einzelne Zellen betrifft (Kreuzberg et al.,

1997). Die Apoptose läuft unter genetischer Kontrolle ab und ist deshalb mit einer nachweisbaren de-novo-Expression von Regulationsproteinen verbunden. Nach Controlled Cortical Impact Injury konnte die vermehrte Bildung solcher Apoptose assoziierter Regulationsproteine, wie z.B. bax als Promotor und bcl-2 als Inhibitor der Apoptose nachgewiesen werden (Busse et al., 1998). Sie sind vermutlich Zeichen der Frühphase der Apoptose. Anhand der sog. TUNEL Technik, die das morphologische Korrelat der Apoptose - der Fragmentation der DNA im Bereich des Zellkerns - nachweist, konnte die Existenz apoptotisch untergehender Zellen nach experimentellem Trauma bestätigt werden (Clark et al., 1997). Wie groß der Anteil der Apoptose nach traumatischer Hirnschädigung am gesamten sekundären Hirnschaden tatsächlich ist und welche Bedeutung therapeutische Interventionsmöglichkeiten haben, ist bis heute noch nicht geklärt (Chopp et al., 1999).

#### 4.4.3 *Axon-Schaden*

Einen diffuser axonaler Hirnschaden nach Controlled Cortical Impact Injury ist gemäß der oben beschriebenen Ergebnisse nicht nachweisbar. Axonale Läsionen sind ausschließlich auf den perikontusionellen Bereich beschränkt. Der diffuse Axonschaden stellt damit kein Charakteristikum des Traumas nach dem Controlled Cortical Impact Injury dar und soll hier in Bezug auf die allgemeine Bedeutung des diffusen Axonschadens nur in kurzer Übersicht besprochen werden.

Die Ausdehnung des diffusen Axonschadens steht in direkter Beziehung zur Schwere des neurologischen Defizits und hat Bedeutung für das klinische Outcome des Patienten (Adams et al., 1989; Genarelli et al., 1982; Oppenheimer, 1968). Klinische und experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, daß unmittelbar einsetzendes und persistierendes Koma bei schwerem SHT mit ausgedehntem, diffusem Axonschaden verbunden ist. Man unterscheidet beim Axonschaden zwischen dem durch mechanische Scherkräfte, akut entstandenen und dem verzögert einsetzenden sekundären Axonschaden (Povlishock, 1985). Es ist nicht geklärt, wie hoch der Anteil des sekundären Axonschadens im Vergleich zum primären tatsächlich ist. Der sekundäre Axonschaden ist von Povlishock genauer untersucht worden (Povlishock, 1985). So verursachte ein relativ leichtes Trauma Veränderungen innerhalb der Axone, die zu Unterbrechung des axonalen Transports führten, nicht jedoch zur kompletten Zertrennung. Daraus resultiert aus einem Aufstau nicht weiter transportierter Substanzen und Organellen

eine axonale Schwellung, die sekundär zur Abtrennung des Axons führt. Diese sekundäre Axotomie ist Teil des sekundären posttraumatischen Hirnschadens und läuft in erster Linie innerhalb der ersten 24 Stunden ab (Povlishock, 1992).

Die hier gezeigten Untersuchungen können anhand der Bielschowsky-Färbung einen Axonschaden anhand der Axonschwellungen im perikontusionellen Bereich nachweisen. Ein diffuses Verteilungsmuster ist jedoch nicht zu beobachten. Dies erklärt die relativ geringe Ausprägung neurologischer Schädigung bei den Tieren, die keine Vigilanzeinschränkungen oder Verhaltensveränderungen aufwiesen. In dem Versuchsaufbau, wie er in dieser Arbeit angewendet wurde, ist der Teilaspekt des diffusen Axonschadens nach SHT nicht zu untersuchen. Deshalb modifizierten Genarelli und Mitarbeiter das CCII und setzten eine zusätzliche kontralaterale Trepanation vor Auslösung des Traumas. Dies führte zu einer Steigerung von Scherkräften innerhalb des Hirngewebes und verursachte einen diffusen Axonschaden des Hirngewebes (Meaney et al., 1994).

#### 4.5 Anwendung

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Anwendung des Modells für Therapiestudien. Dafür wurde exemplarisch eine potentiell neuroprotektive Substanz verwendet.

##### 4.5.1 *Therapie des Schädel-Hirn-Traumas*

Die Erweiterung der Therapie des SHT zur gezielten Behandlung spezifischer Mechanismen des sekundären Hirnschadens ist nach wie vor eine Herausforderung. Die heute in der klinischen Routine angewendeten Therapie-Strategien richten sich nach den Guidelines der American Association of Neurological Surgeons (AANS) bzw. des European Brain Injury Consortiums (EBIC) (Bullock et al., 1995; Maas et al., 1997). Demnach beschränkt sich nach aktueller Datenlage die Intensivtherapie des SHT auf die Stabilisierung des Patienten sowie Vermeidung und Therapie eventueller Komplikationen, wie z.B. die arterielle Hypotension und Hypoxie. Der Routine-Einsatz von neuroprotektiven Substanzen, die die pathophysiologischen Mechanismen von Mediatorsystemen des sekundären Hirnschadens hemmen, ist bis heute nicht möglich. Es sind in den letzten Jahren zwar Fortschritte gemacht



worden, in der Aufklärung der pathophysiologischen Vorgänge des sekundären Hirnschadens nach SHT. So sind eine Reihe von potentiell neuroprotektiven Substanzen entwickelt worden, die in diese Mechanismen eingreifen sollen und die sich aufgrund experimenteller Studien als vielversprechende neuroprotektive Substanzen den Weg bis zur klinischen Testung gebahnt haben. Bis heute konnte jedoch keine dieser Studien den Einsatz für die klinische Routine rechtfertigen. Diese Tatsache hat nach Bullock und Faden folgende Gründe: Ein zu allgemein gehaltenes Studiendesign schließt häufig jedes schwere SHT ohne Berücksichtigung der einzelnen vorliegenden pathologischen Teilaspekte ein. Das Studienziel wird häufig auf die allgemeine Verbesserung des Outcomes der Patienten ausgelegt. Dieses ungezielte Vorgehen ist äußerst teuer, benötigt einen enormen Zeitaufwand und eine sehr hohe Anzahl von Patienten. Es besteht die Gefahr, daß solche Studien fälschlicherweise keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ergeben, nur weil die Anzahl der Patienten letztendlich zu klein war (Bullock, 1997; Faden, 1997). Ein weiteres Problem ist, daß häufig nur wenig experimentelle Daten ausreichen, um den Einsatz einer Substanz für die klinische Testung zu rechtfertigen (Bullock, 1997).

Bullock beschreibt drei wesentliche Punkte zur Verbesserung der Testung neuroprotektiver Substanzen mit dem Ziel, einerseits eine sinnvolle experimentelle Basis für geplante klinische Studien zu liefern und andererseits die Vereinfachung der klinischen Studien zu gewährleisten (Bullock, 1997):

*Erstens* Festlegung eines Studienziels, bei dem der Einfluß einer Substanz auf ein Teilaspekt des SHT als Studienendpunkt bestimmt wird. Dieser Studienendpunkt sollte nachweislich ein Prediktor des Outcomes beim SHT sein. Der Vorteil liegt zum einen darin, daß die Patienten entsprechend des gewählten Studienendpunkts, den die Substanz positiv beeinflussen soll, ausgewählt werden können. Darüber hinaus bewirkt es die Senkung von Dauer und Kosten der Studien. Ein inzwischen häufig angewendeter Endpunkt ist z.B. der intrakranielle Druck. Dieser wurde z.B. bei den Studien mit dem Radikalfänger PEG-SOD (Muizelaar et al., 1993) und mit dem kompetitiven NMDA-Antagonisten "Selfotel" (CGS 19755) (Bullock et al., 1994) herangezogen.

*Zweitens* wird die Patientenselektion anhand besonderer Teilaspekte des SHT genannt. Grundlage hierfür ist die von Bullock vorgestellte Unterteilung der Teilaspekte des Hirngewebeschadens nach SHT (Bullock und Fujisawa, 1992). Es beinhaltet die Punkte Hämatom, Kontusion, diffuser Axonschaden, Ischämie und wäre noch um den Punkt

Hirnödem zu erweitern. Diese Teilaspekte treten im Rahmen eines SHT nie isoliert auf. Im Einzelfall nehmen jedoch einzelne Teilaspekte eine führende Rolle in dem Krankheitsverlauf ein. In experimentellen Studien haben Testsubstanzen in unterschiedlichen tierexperimentellen Modellen je nach dem modellierten Teilspekt des SHT unterschiedliche Wirkung gezeigt. Solche Untersuchungen sollten als Grundlage dafür dienen, daß eine Unterteilung der Patienten entsprechend der im Krankheitsverlauf dominierenden Teilaspekte erfolgt. Diese Substanzen könnten dadurch so getestet werden, daß unter klinischen Bedingungen gezielt die Wirkung auf den entsprechenden Teilspekt untersucht wird.

Dies wurde retrospektiv (jedoch nie prospektiv) bei der klinischen Studie des Kalzium-Kanal-Blockers Nimodipin beim schweren SHT untersucht. In dieser Studie hatte sich in der Subgruppenanalyse der Patienten mit traumatischer Subarachnoidalblutung ein günstiger Effekt auf das klinisch-neurologische Outcome durch Nimodipin gezeigt (Teasdale et al., 1992). Bei der gesamten Gruppe der Patienten mit schwerem SHT konnte keine Wirksamkeit durch die Behandlung mit Nimodipin nachgewiesen werden.

Daraus ergibt sich *drittens* die ausgedehnte tierexperimentelle Testung potentiell neuroprotektiver Substanzen zur Bestimmung des optimalen Ansatzpunktes eines Teilaspektes nach SHT. Einer der oben erwähnten Kritikpunkte beinhaltet den zu schnellen Einstieg in die klinische Studie ohne ausreichende tierexperimentelle Evaluation einer Substanz. Um die entsprechende Auswahl aus der Vielzahl neu entwickelter Substanzen zu treffen, ist die Testung in einem entsprechendem tierexperimentellen Modell notwendig. Inzwischen stehen für die Nachstellung des SHT verschiedene Modelle zur Verfügung. Neben den bereits erwähnten Modellen - Weight Drop-Modell, Fluid Percussion-Modell und Kältenekrose-Modell - sind darüber hinaus weitere Modelle in der Anwendung, die eine Gewichtung auf andere Teilaspekte des SHT bieten. So stehen entsprechend der Teilaspekte nach Bullock für das posttraumatische Hämatom z.B. die Modelle des subduralen (Miller et al., 1990) oder der intrazerebralen (Bullock et al., 1984) Hämatoms zur Verfügung. Die Ischämie/Hypoxie wird am besten durch die Modelle der fokalen oder globalen Ischämie oder verschiedene Hypotensionsmodelle nachgestellt (Kroppenstedt et al., 1999a; Smith et al., 1984; Tamura et al., 1981). Vorzugsweise sollte das Medikament aufgrund seines pathophysiologischen Wirkungsprinzips in dem Tiermodell getestet werden, wo der Teilspekt am besten nachgestellt wird und in dem das Medikament die günstigste Wirkung zu erzielen verspricht. Bei positivem Effekt sollten sich weitere Tests in anderen Modellen

anschließen, die diesen Teilaspekt berücksichtigen und der klinischen Situation möglichst nahe kommen.

Das Controlled Cortical Impact Injury stellt ein tierexperimentelles Trauma-Modell dar, welches viele Aspekte des SHT imitiert. Der Aspekt der traumatischen Kontusion und der damit verbundenen Blutungstypen steht dabei im Vordergrund.

#### 4.5.2 *Therapiestudie mit einem 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonisten*

Neben Glutamat-Rezeptor-Antagonisten oder Radikalfängern, die in den letzten Jahren auf ihre neuroprotektive Wirkung nach experimentellem Schädel-Hirn Trauma getestet wurden, ist kürzlich eine neue Substanz-Klasse entwickelt worden: Substanzen mit agonistischen Eigenschaften am 5-Hydroxytryptamin<sub>1A</sub>(5-HT<sub>1A</sub>)-Rezeptor. Die Aktivierung des Rezeptors führt zu einer Öffnung eines mit einem G-Protein verbundenen Kalium-Kanals, was die Hyperpolarisation der Zellmembran zur Folge hat. Diese Hyperpolarisation wird für die potentiell neuroprotektive Wirkung am 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor verantwortlich gemacht. Man geht davon aus, daß das Neuron dadurch in einen elektrisch "stabilen" Zustand versetzt wird, der exzitatorische Reize, wie eine Depolarisation durch Glutamat, blockieren könnte. Diese Substanz-Klasse bewirkte in Modellen der zerebralen Ischämie eine Reduktion des postischämischen Hirnschadens. So zeigten Bielenberg und Burckardt in dem Modell der fokalen zerebralen Ischämie eine Reduktion des Infarktareals um 60% nach Gabe des 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten Bay R 1531, der Vorläufersubstanz von Bay X 3702 (Bielenberg und Burkhardt, 1990). Prehn und Mitarbeiter verwendeten den 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten CM 57593 in Modellen fokaler und globaler Ischämie und fanden eine signifikante Reduktion des kortikalen Infarktvolumens und des neuronalen Zellschadens im Bereich der CA1 Region des Hippokampus (Prehn et al., 1991). Bode-Greuel und Mitarbeiter verwendeten die 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten Bay R 1531, 8-OH-DPAT, Ipsapiron und Gepiron im Modell der transienten zerebralen Ischämie beim Frettchen. Während 8-OH-DPAT und Gepiron keinen Einfluß auf das Überleben der hippokampalen CA1-Neurone zeigten, berichten die Autoren von einer Reduktion des ischämisch bedingten Zellverlustes nach Gabe von Ipsapiron um 53% und nach Gabe von Bay R 1531 um 100% (Bode-Greuel et al., 1990). Demgegenüber konnten Wieloch und Mitarbeiter zeigen, daß die Hemmung der Synthese von 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) vor Induktion zerebraler Ischämie den postischämischen histopathologischen Schaden

vergrößerte (Wieloch et al., 1986). Diese Untersuchungen stützen die Theorie von der potentiellen neuroprotektiven Wirkung 5-HT<sub>1A</sub>-agonistischer Substanzen.

Im Gegensatz zu den Erwartungen bewirkte die Gabe des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonisten Bay X 3702 keinen positiven Effekt nach Controlled Cortical Impact Injury. Vielmehr wurde der posttraumatische Schaden durch die Behandlung mit Bay X 3702 vergrößert. Es kam zu einer Zunahme des Kontusionsvolumens um 43% im Vergleich zur Plazebo-Gruppe.

Hierfür sind verschiedene Gründe verantwortlich. Der hypotensive Effekt von Bay X 3702 mit Senkung des mittleren arteriellen Blutdrucks im Mittel um 21% ist aufgrund der signifikanten Korrelation zwischen der Größe des Kontusionsvolumens und der Ausprägung des Blutdruckabfalls nachweislich dafür mitverantwortlich. Eine mögliche dosisabhängige hypotensive Wirkung von 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonisten ist bereits beschrieben worden (Martin et al., 1987). Auch in anderen Studien wird über hypotensive Phasen nach der Applikation von 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonisten berichtet (McCall et al., 1994). McCall und Mitarbeiter zeigten, daß 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten eine hemmende Wirkung auf die Aktivität von sympathikotonen Hirnstammarealen haben. Diese beeinflußt sowohl den mittleren arteriellen Blutdruck als auch die Herzfrequenz negativ (McCall et al., 1987). Der 5-HT<sub>1A</sub>-Agonist 8-OH-DPAT, dessen Eigenschaften am meisten untersucht wurden, verringert den mittleren arteriellen Blutdruck dosisabhängig (Doods et al., 1985). Prehn und Mitarbeiter berichten von einer dosisabhängigen hypotensiven Wirkung des 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten CM 57493, welche vermutlich zu einem Verlust der in geringerer Dosierung beobachteten Neuroprotektion nach globaler Ischämie im Rattenmodell führte (Prehn et al., 1991). Die vorgestellten Untersuchungen demonstrieren einen signifikanten hypotensiven Effekt nach Gabe von 0,01 mg/kg KG Bay X 3702. Dieses Phänomen kann bei allen Tieren beobachtet werden und ist auch bei den Langzeituntersuchungen nach der zweiten und dritten Applikation der Substanz nachweisbar. Im Rahmen dieser von dem 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten verursachten langanhaltenden Blutdruckreduktion ist eine Verschleierung des potentiellen therapeutischen Effekts der Substanz in der vorliegenden Studie wahrscheinlich. Der Grund hierbei liegt vermutlich in der kritischen Reduktion der zerebralen Perfusion.

Der sekundäre traumatische Hirnschaden wird durch eine verminderte zerebrale Perfusion gefördert, die im Rahmen einer arteriellen Hypotension oder einer zerebralen Ischämie entstehen kann. Cherian und Mitarbeiter zeigten, daß die sekundäre bilaterale Okklusion der Karotiden nach kortikaler Kontusion bei der Ratte zu einer Verschlechterung des

neurologischen Outcomes und zur signifikanten Steigerung des Kontusionsvolumens führt (Cherian et al., 1996). Dementsprechend berichteten Jenkins und Mitarbeiter, daß die vorübergehende Okklusion der Karotiden in Verbindung mit hämorrhagischer Hypotension bis zu 50 mmHg über 6 Minuten die Vulnerabilität des traumatisierten Hirngewebes potenzierte (Jenkins et al., 1989). Kroppenstedt und Mitarbeiter zeigten den Zusammenhang zwischen der Senkung des arteriellen Blutdrucks und Größe des Kontusionsvolumens. Bei traumatisierten Ratten vergrößerte sich das Kontusionsvolumen bei stufenweise herabgesetzten systemischen Blutdruck durch die sog. hypobare Hypotension unterhalb der kritischen Grenze von 70 mmHg (Kroppenstedt et al., 1999a). Systemische Insulte bei traumatisierten Patienten durch arterielle Hypotension sind assoziiert mit einer Steigerung von Morbidität und Mortalität (Miller et al., 1978). Darüber hinaus wurde gezeigt, daß Patienten mit schwerem SHT, bei denen Episoden eines durch arterielle Hypotension verursachten reduzierten zerebralen Perfusionsdrucks beobachtet wurden, ein erhöhtes Risiko für ein schlechteres neurologisches Outcome besitzen (Chesnut et al., 1993).

Der in dieser Arbeit gezeigte Anstieg des Kontusionsvolumens bei einer Verringerung des systemischen arteriellen Blutdrucks unter 70 mmHg (Abb. 3.21.) ist vermutlich auf die konsekutiv entstandene geringere zerebrale Perfusion zurückzuführen.

Vor dem Hintergrund dieser Überlegungen kann der hypotensive Effekt, der in der verwendeten Dosierung nicht erwartet wurde, eventuell auf eine Überdosierung von Bay X 3702 zurückzuführen sein. Wie Prehn und Mitarbeiter zeigten, war die beobachtete Hypotension dosisabhängig und maskierte den neuroprotektiven Effekt, der in geringerer Dosierung des 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten gesehen wurde (Prehn et al., 1991). Weitere Untersuchungen z.B. mit anderen Dosierungen der vorliegenden Substanz müßten diese Frage endgültig klären.

Darüber hinaus zeigen sich in der vorliegenden Studie Hinweise, die auf agonistische Eigenschaften von Bay X 3702 auf andere 5-HT-Rezeptor-Subtypen hindeuten könnten. Dieser Hinweis liegt in der triphasischen Reaktion des arteriellen Blutdrucks nach Gabe der Substanz. Es ist beschrieben, daß die intravenöse Gabe von Serotonin eine in drei Phasen ablaufenden arterielle hypotensive Reaktion zu Folge hat. Dieser Verlauf wurde auf die Aktivierung von verschiedenen 5-HT-Rezeptor-Subtypen zurückgeführt (Page und McCubbin, 1953). Die Beobachtung der Blutdruckreaktion bei den einzelnen Tieren nach Gabe von Bay X 3702 zeigte einen ähnlichen Verlauf (Abb. 3.19.). Die Applikation

verursachte einen nur mit geringer Latenz einsetzenden Blutdruckabfall. Dieser war gefolgt von einer wenige Minuten dauernden Blutdruck steigernden Phase. Hiernach folgt erneut eine hypotensive Episode, bei der der Tiefpunkt ca. 10 Minuten nach Injektion erreicht wird. Von hier aus tritt eine langsam dauernde Erholungsphase ein. Es ist aufgrund dieser Beobachtung zu vermuten, daß Bay X 3702 in der vorliegenden Dosierung und bei den verwendeten Versuchstieren neben der Selektivität gegenüber dem 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor Subtypen zusätzlich eine Affinität zu den anderen Subtypen dieser Rezeptorklasse besitzen könnte.

Daraus ergeben sich weitere Überlegungen, die die therapeutische Wirkung von Bay X 3702 beeinflussen könnten. Im Gegensatz zu der Wirkung bei Aktivierung von 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren wurden exzitatorische Effekte durch Agonisten am 5-HT<sub>2</sub> Rezeptor beschrieben (Saruhashi und Young, 1994; Wiernsperger, 1990). Dies beinhaltet einerseits die Depolarisation des Neurons und damit die Aktivierung ladungsabhängiger Ionenkanäle, die den Einstrom von Na<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup> nach intrazellulär ermöglichen, und andererseits die weitere Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren wie Glutamat (Wiernsperger, 1990). Substanzen mit agonistischer Wirkung am 5-HT<sub>2</sub> Rezeptor führten nachweislich zu einer Zunahme des postischämischen Schadens nach experimenteller Ischämie bei der Ratte (Globus et al., 1992). Dies bedeutet, daß eine neuroprotektive Wirkung am 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor durch Wirkungen an anderen Rezeptorsubtypen konkurrieren könnte. Diese Aussage bedarf weiterer intensiverer Untersuchungen.

Wie bereits erwähnt, konnten bei Substanzen mit agonistischen Eigenschaften am 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor in Modellen der zerebralen Ischämie neuroprotektive Eigenschaften nachgewiesen werden (Bielenberg und Burkhardt, 1990; Bode-Greuel et al., 1990; Prehn et al., 1991). Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich zum ersten Mal mit der Wirkung einer solchen Substanz auf den posttraumatischen Hirnschaden. Bis jetzt konnte diese protektive Wirkung nicht bestätigt werden. Trotz der schon erwähnten Gründe für diese Diskrepanz der Ergebnisse wird dargelegt, welche Bedeutung die Verwendung der unterschiedlichen Versuchsmodelle auf dieses Ergebnis haben könnte. Ein Unterschied der experimentellen zerebralen Ischämie gegenüber der traumatischen Läsion liegt in der Verteilung des Gewebeschadens. Während bei der ischämischen Läsion der Neuronenuntergang aufgrund mangelnder Perfusion v.a. in den Basalganglien, dem Kortex und dem Hippokampus lokalisiert ist, ist beim mechanisch induzierten traumatischen Hirnschaden durch das CCII fast ausschließlich kortikales Gewebe vom Zelluntergang betroffen. Es wurden bei der hier

verwendeten Traumastärke keine hippokampalen Strukturen von der Nekrose betroffen. Untersucht man die Rezeptordichte in der Anatomie des Rattengehirns könnte sich daraus die unterschiedliche Effektivität der untersuchten Substanz in den verschiedenen Modellen erklären. Palacios und Mitarbeiter zeigten die Verteilung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors anhand von radioaktiv markiertem [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT im Rattenhirn (Palacios et al., 1990). Hier liegt die höchste Rezeptordichte in den Arealen des Hippokampus, des Septums und der Raphe-Kerne. Im Bereich des Kortex ließen sich v.a. in den tieferen Schichten eine hohe Rezeptordichte nachweisen. Die oberflächlichen Areale zeigten Verteilungen geringerer Dichte. Hier liegt ein wesentlicher Unterschied in der potentiellen Wirkung einer solchen Substanz im Trauma-Modell gegenüber dem Ischämie-Modell. Der potentielle Angriffspunkt der Substanz in Bereichen sekundärer Zellschädigung ist möglicherweise im verwendeten Traumamodell geringer als in einem Modell der zerebralen Ischämie. Prehn und Mitarbeiter betonen in ihrer Untersuchung einen ausgeprägteren neuroprotektiven Effekt in Bereichen hoher 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Dichte (Prehn et al., 1991).

Bei der Ödemquantifizierung zeigt sich eine moderate Verringerung der posttraumatischen Hemisphärenschwellung und des posttraumatischen Wassergehalts bei den mit Bay X 3702 behandelten Tieren. Eine signifikante Korrelation zwischen Ausdehnung des Ödems und dem Ausmaß der Blutdruckreduktion konnte nicht gezeigt werden. Dennoch ist mit einem  $p=0,6$  bei der Korrelation Wassergehalt und MAD nach Substanzapplikation ein tendenzieller Zusammenhang zwischen den Parametern zu diskutieren. Dieser Zusammenhang wäre damit zu erklären, daß bei systemischer Hypotension durch den geringeren hydrostatischen Kapillardruck bei offener Blut-Hirn-Schranke ein geringerer transkapillärer Übertritt von Plasma vom intravasalen Kompartiment in den Extravasalraum erfolgt (s.o. Kap. 4.2.1.). Wahl und Mitarbeiter diskutierten dementsprechend, daß eine massive Freisetzung von Serotonin durch dessen Blutdruckreduktion der Entstehung eines Hirnödems bei gestörter Blut-Hirn-Schranke entgegenwirken (Wahl et al., 1993). Milhorat und Mitarbeiter konnten zeigen, daß die Ausdehnung des vasogenen Hirnödems nach kortikaler Kälteläsion mit medikamentös verursachter Blutdrucksenkung verringert wurde (Milhorat et al., 1989). Diese Ergebnisse unterstützen die Korrelation, wie sie in den vorliegenden Untersuchungen gefunden wurde. Im Gegensatz dazu wurde in einer experimentellen Studie gezeigt, daß nach hämorrhagischem Schock mit einem MAD von 50 mmHg über 30 Minuten nach Kältenekrose der posttraumatische Wassergehalt gesteigert wurde (Zhuang et al., 1993). Demnach ist die

Datenlage nicht eindeutig. Die Bedeutung des vasogenen Hirnödems für das klinisch-neurologische Outcome und die Beeinflussung des Hirnödems durch den zerebralen Perfusionsdruck wird noch kontrovers diskutiert.

Die vorliegende Therapiestudie unterstreicht die Bedeutung des sekundären hypotensiven Insults auf den posttraumatischen Hirnschaden. Aufgrund dessen konnte mit der Untersuchung in der gewählten Dosierung keine positive Aussage über den möglichen therapeutischen Effekt von Bay X 3702 gemacht werden. Es ist anzunehmen, daß die substanzinduzierte Hypotension eine potentiell neuroprotektive Wirkung auf das Kontusionsvolumen verdeckt. Jedoch bekräftigt die vorliegende Studie die Bedeutung des Monitorings der Vitalparameter, im besonderen des MAD, für jede Medikamentenstudie.

Die sinnvolle Anwendung des Traumamodells CCII für die Fragestellung nach der Wirkung eines Medikaments konnte trotz dieses Ergebnisses bestätigt werden. Das Modell liefert zuverlässige, reproduzierbare und gut quantifizierbare Daten mit geringer Streuung, die den Vergleich zweier Studiengruppen zulassen. Die Versuchsdurchführung ist verhältnismäßig einfach und der verbundene Aufwand steht in vernünftigem Verhältnis zu den erzielten Ergebnissen. Die Tiere können intensiv während der Versuchsdurchführung überwacht werden, so daß eine kontrollierte Untersuchung gewährleistet ist.



## LITERATURVERZEICHNIS

- Adams JH, Doyle D, Ford I (1989): Diffuse axonal injury in head injury: definition, diagnosis, and grading. *Histopathology* 15:49-59.
- Andersen TE (1982): A controlled pneumatic technique for experimental spinal cord contusion. *J Neurosci Meth* 6:327-333.
- Anderson DK, Hall ED (1994): Lipid hydrolysis and free radical formation in the central nervous system trauma. in: Salzman SK, Faden AI, (eds.), *Neurobiology of Central Nervous System Trauma*, New York: Oxford University Press, 131-138.
- Asgeirsson B, Grände P-O, Nordström C-H (1995a): The Lund concept of post traumatic brain edema therapy. *Acta Anaesth Scand* 39:112-114.
- Asgeirsson B, Grande PO, Nordstrom CH, Messeter K, Sjöholm H (1995b): Cerebral haemodynamic effects of dihydroergotamine in patients with severe traumatic brain lesions. *Acta Anaesthesiol Scand* 39:922-30.
- Auer RN, Kalmino H, Olsson Y, Siesjö BK (1985a): The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. I. Light and electron microscopic findings in the rat cerebral cortex. *Acta Neuropathol* 67:13-24.
- Auer RN, Kalmino H, Olsson Y, Siesjö BK (1985b): The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. II. Light and electron microscopic findings in the rat hippocampus. *Acta Neuropathol* 67:25-36.
- Auer RN, Kalmino H, Olsson Y, Wieloch T (1985c): The dentate gyrus in hypoglycemia. Pathology implicating excitotoxin mediated neuronal necrosis. *Acta Neuropathol* 67:279-288.
- Baethmann A, Kempfski OS (1997): Pathophysiologie des Hirnödems. *Zentralbl Neurochir* 58:20-29.
- Baethmann A, Maier-Hauff K, Kempfski O, Unterberg A, Wahl M, Schürer L (1988): Mediators of brain edema and secondary brain damage. *Crit Care Med* 16:972-978.
- Baethmann A, Maier-Hauff K, Schürer L (1989): Release of glutamate and free fatty acids in vasogenic brain edema. *J Neurosurg* 70:578-91.
- Banik NL, McAlhaney WW, Hogan EL (1985): Calcium stimulated proteolysis in myelin: Evidence for a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated neutral proteinase associated with purified myelin of rat CNS. *J Neurochem* 45:581-588.
- Baskaya MK, Rao AM, Dogan A, Donaldson D, Dempsey RL (1997): The biphasic opening of the blood brain barrier in the cortex and hippocampus after traumatic brain injury. *Neurosci Letters* 226:33-36.
- Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM (1986a): Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 17:1304-1308.
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM (1986b): Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurological examination. *Stroke* 17:472-476.
- Betz AL, Iannotti F, Hoff JT (1986): Brain edema: a classification based on blood brain barrier integrity. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1:133-154.

- Bielenberg GW, Burkhardt M (1990): 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> agonists. A new therapeutic principle for stroke treatment. *Stroke Suppl* 21:161-163.
- Bode-Greuel KM, Klisch J, Horvarth E, Glaser T, Traber J (1990): Effects of 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub>-receptor agonists on hippocampal damage after transient forebrain ischemia in the mongolian gerbil. *Stroke Suppl* 21:164-166.
- Bradbury M (1979): The concept of blood brain barrier. Chichester: John Wiley.
- Bryan RMJ, Cherian L, Robertson C (1995): Regional cerebral blood flow after controlled cortical impact injury in rats. *Anesth Analg* 80:687-95.
- Bullock R (1997): Experimental drug therapies for head injury in: Narayan RK, Wilberger JE, Povlishock JT, (eds.), *Neurotrauma*, New York: McGraw-Hill, 375-391.
- Bullock R, Chesnut RM, Clifton G (1996): Guidelines for the management of severe head injury. *J Neurotrauma* 13:639-734.
- Bullock R, Fujisawa H (1992): The role of glutamate antagonist for the treatment of CNS injury. *J Neurotrauma* 9:443-461.
- Bullock R, Katake A, Stewart L (1994): The glutamate antagonist CGS 19755 lowers ICP and improves CPP in severely head injured humans. in: Nagai H, Kamiya K, Ishiis I, (eds.), *Intracranial Pressure IX*, Tokyo: Springer Verlag, 238-241.
- Bullock R, Maxwell WL, Graham DI (1991): Glial swelling following cerebral contusion: an ultrastructural study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 54:427-434.
- Bullock R, Mendelow AD, Teasdale GM, Graham DI (1984): Intracranial haemorrhage induced at arterial pressure in the rat. Part 1: Description of technique, ICP changes and neuropathological findings. *Neurol Res* 6:184-8.
- Bullock R, Statham P, Patterson J, Wyper D, Hadley D, Teasdale E (1990): The time course of vasogenic brain edema after focal human head injury - evidence from SPECT mapping of blood brain barrier defects. *Acta Neurochir Suppl* 51:286-288.
- Busse R, van Landeghem FKH, Thomale U-W, Kroppenstedt S-N, Unterberg AW, Stoltenburg-Didinger G (1998): Apoptosis and necrosis following controlled cortical impact injury in rats. *Clin Neuropath* 17:286-287.
- Cherian L, Robertson CS, Goodman JC (1996): Secondary insults increase Injury after Controlled Cortical Impact in rats. *J Neurotrauma* 13:371-383.
- Cherian L, Robertson CS, Contant CF, Jr., Bryan RM, Jr. (1994): Lateral cortical impact injury in rats: cerebrovascular effects of varying depth of cortical deformation and impact velocity. *J Neurotrauma* 11:573-85.
- Chesnut RM, Marshall SB, Piek J, Blunt BA, Klauber MR, Marshall LF (1993): Early and late systemic hypotension as a frequent and fundamental source of cerebral ischemia following severe brain injury in the Traumatic Coma Data Bank. *Acta Neurochir Suppl* 59:121-5.
- Choi DW (1992): Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23:1261-1276.
- Chopp M, Li Y, Jiang N (1999): Increase in apoptosis and concomitant reduction of ischemic lesion volume and evidence for synaptogenesis after transient focal cerebral ischemia in rat treated with staurosporine. *Brain Res* 828:197-201.
- Clark SB, Kochanek PM, Dixon CE, et al. (1997): Early neuropathologic effects of mild or moderate hypoxemia after Controlled Cortical Impact Injury in rats. *J Neurotrauma* 14:179-189.

- Colcios MA, Dixon CE, Dash PK (1996): Delayed, selective neuronal death following experimental cortical impact injury in rats: possible role in memory deficits. *Brain Res* 739:111-119.
- Collier HOJ (1962): Multiple toe pinch test for potential analgesic drugs. in: Keele CA, Smith R, (eds.), *The assessment of pain in man and animal*, London: Universities Federation for Animal Welfare, 262-270.
- Collins JG (1990): Types of injuries by selected characteristics. United States, 1985-1987. *Vital Health Stat* 10:175.
- Cortez SC, McIntosh TK, Noble LJ (1989): Experimental fluid percussion brain injury: vascular disruption and neuronal and glial alterations. *Brain Res* 482:271-82.
- Cserr HF, Patlak CS (1991): Regulation of brain volume under isosmotic and anisosmotic conditions. *Adv Comp Environ Physiol* 9:61-80.
- D'Avella D, Germano A, Santoro G (1990): Effect of experimental subarachnoid hemorrhage on CSF eicosanoids in the rat. *J Neurotrauma* 7:121-129.
- Denny-Brown D (1945): Cerebral concussion. *Physiol Rev* 25:296.
- Denny-Brown D, Russel WR (1945): Experimental cerebral concussion. *Brain* 64:93.
- Dewitt DS, Hayes RL, Lyeth BG (1988): Effects of traumatic brain injury on cerebral blood flow and metabolism: Autodiographic studies. *Anesth Rev* 15:31-32.
- Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghmai AA, Hayes RL (1991): A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods* 39:253-262.
- Dixon CE, Hayes RL (1997): Fluid percussion and cortical impact models of traumatic brain injury. in: Narayan RK, Wilberger JE, Povlishock JT, (eds.), *Neurotrauma*, New York: McGraw Hill, 1337-1346.
- Dixon CE, Lyeth BG, Povlishock JT, et al. (1987): A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurosurg* 67:110-119.
- Doods HN, Kalkman HO, de Jong A, et al. (1985): Differential selectivities of RU 24969 and 8OH-DPAT for the purported 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> binding sites. Correlation between 5-HT<sub>1A</sub> affinity and hypotensive activity. *Eur J Pharmacol* 112:363.
- Duvdevani R, Roof RL, Fulop Z, Hoffman SW, Stein DG (1995): Blood-brain barrier breakdown and edema formation following frontal cortical contusion: does hormonal status play a role? *J Neurotrauma* 12:65-75.
- Ebisu T, Naruse S, Horikawa Y (1993): Discrimination between different types of white matter edema with diffusion-weighted MR imaging. *J Magn Res Imag* 3:863-868.
- Eriskat J, Schurer L, Kempinski O, Baethmann A (1994): Growth kinetics of a primary brain tissue necrosis from a focal lesion. *Acta Neurochir Suppl* 60:425-427.
- Faden AI (1997): Pharmacological treatment approaches for brain and spinal cord trauma. in: Narayan RK, Wilberger JE, Povlishock JT, (eds.), *Neurotrauma*, New York: McGraw Hill, 1479-1490.
- Faden AI, Chan PH, Longar S (1987): Alteration in lipid metabolism, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity and tissue water content of spinal cord following experimental traumatic injury. *J Neurochem* 48:1809-1816.
- Fields RD, Yu C, Nelson PG (1991): Calcium, network activity, and the role of NMDA channels in synaptic plasticity in vitro. *J Neurosci* 11:134-146.

- Foda MA, Marmarou A (1994): A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg* 80:301-313.
- Forbes ML, Hendrich KS, Kochanek PM, et al. (1997): Assessment of cerebral blood flow and CO<sub>2</sub> reactivity after controlled cortical impact by perfusion magnetic resonance imaging using arterial spin-labeling in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:865-874.
- Foster A, Fagg G (1987): Neurobiology. Taking apart NMDA receptors. *Nature* 329:395-396.
- Genarelli TA, Thibault LE, Adams JH (1982): Diffuse axonal injury and traumatic coma in the primate. *Ann Neurol* 12:564-574.
- Glenner GG (1969): Tetrazolium salts. in: Little RD, (eds.), *H.J. Conn's Biological Stains*, Baltimore: Williams & Wilkins, 154-162.
- Goodman JC, Cherian L, Bryan RMJ, Robertson CS (1994): Lateral cortical impact injury in rats: pathologic effects of varying cortical compression and impact velocity. *J Neurotrauma* 11:587-597.
- Graham DI, Gennarelli TA (1997): Trauma in: Graham DI, Lantos PL, (eds.), *Greenfield's Neuropathology*, London, Sydney, Auckland: Arnold, 197-262.
- Gurdjian ES, Lissner HP, Webster HP, Latimer FR, Haddad BF (1954): Studies on experimental concussion relation of physiologic effect time duration of intracranial pressure increase at impact. *Neurology* 4:674-681.
- Hall ED (1997): Injury mechanisms and therapies: Free radicals and lipid peroxidation. in: Narayan RK, Wilberger JE, Povlishock JT, (eds.), *Neurotrauma*, New York: McGraw Hill, 1405-1419.
- Hall ED, Braughler JM (1991): Free radicals in CNS injury. in: Waxman SG, (eds.), *Molecular and Cellular Approaches to the Treatment of Brain Diseases*, New York: Raven Press, 81-105.
- Iino M, Ozawa S, Tsuki K (1990): Permeation of calcium through excitatory amino acid receptor channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol* 424:151-165.
- Ikeda Y, Wang M, Nakazawa S (1994): Simple quantitative evaluation of blood-brain barrier disruption in vasogenic brain edema. *Acta Neurochir Suppl* 60:119-120.
- Isayama K, Laurence H, Nishimura MC (1991): Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining to delineate rat brain infarct. *Stroke* 22:1394-1398.
- Ito J, Marmarou A, Barzo P, Fatouros P, Corwin F (1996): Characterization of edema by diffusion-weighted imaging in experimental traumatic brain injury. *J Neurosurg* 84:97-103.
- Jahr CE, Stevens CF (1990): A quantitative description of NMDA receptor channel kinetic behavior. *J Neurosci* 10:1830-1837.
- Jantzen JP, Piek J (1997): Leitlinien zur Primärversorgung von Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma. *Anästhesiologie und Intensivmedizin* 2:89-93.
- Jenkins LW, Moszynski K, Leyth BG, et al. (1989): Increased vulnerability of the mildly traumatized rat brain to cerebral ischemia: the use of controlled secondary ischemia as a research tool to identify common or different mechanisms contributing to mechanical and ischemic brain injury. *Brain Res* 477:211-224.
- Joseph R, Li W, Han E (1993): Neuronal death, cytoplasmic calcium and internucleosomal DNA fragmentation: Evidence of DNA fragments being released from cells. *Brain Res Mol Brain Res* 17:70-76.

- Kamada K, Houkin K, Hida K, Iwasaki Y, Abe H (1995): Serial changes in metabolism and histology in the cold-injury trauma rat brain model--proton magnetic resonance imaging and spectroscopy study. *Neurol Med Chir Tokyo* 35:1-7.
- Kassell NF, Hitchon PW, Gerk MK (1980): Alterations in cerebral blood flow, oxygen metabolism, and electrical activity produced by high dose thiopental. *Neurosurgery* 7:598-603.
- Kawamata T, Katayama Y, Maeda T, et al. (1997): Antioxidant, OPC 14117, attenuates edema formation and behavioral deficits following Cortical Contusion in rats. *Acta Neurochir Suppl* 70:191-193.
- Kearney PA, Ridella SA, Viano DC, Andersen TW (1988): Interaction of contact velocity and cord compression in determining the severity of spinal cord injury. *J Neurotrauma* 5:187-208.
- Kellie G (1824): The kind of appearances observed in the dissection of two or three individuals ... with some reference to the pathology of the brain. *Trans Med Chi Edin* 1:84-169.
- Kempinski OS, Staub F, von Rosen F (1988): Molecular mechanisms of glial swelling in vitro. *Neurochem Pathol* 9:109-125.
- Kempinski OS, Volk C (1994): Neuron-glial interaction during injury and edema of the CNS. *Acta Neurochir Suppl* 60:7-11.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972): Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.
- Kimelberg HK (1995): Current concepts of brain edema. *J Neurosurg* 83:1051-1059.
- Kimelberg HK, Ransom BR (1986): Physiological and pathological aspects of astrocytic swelling. in: Fedoroff S, Vernadakis A, (eds.), *Astrocytes*, Orlando, Fla: Academic Press, 129-166.
- Kita H, Marmarou A (1994): The cause of acute brain swelling after the closed head injury in rats. *Acta Neurochir Suppl* 60:452-455.
- Klatzo I (1967): Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropath Exp Neurol* 26:1-14.
- Klatzo I (1994): Evolution of brain edema concepts. *Acta Neurochir Suppl* 60:3-6.
- Klatzo I, Chui E, Fujiwara K, Spatz M (1980): Resolution of vasogenic brain edema. *Adv Neurol* 28:359-374.
- Klatzo I, Piroux A, Laskowski EJ (1958): The relationship between edema, blood-brain-barrier, and tissue elements in a local brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 17:548-564.
- Klatzo I, Wisniewski HM, Steinwall O, Streicher E (1967): Dynamics of cold injury edema. in: Klatzo I, Seitelberger F, (eds.), *Brain Edema*, New York: Springer, 554-563.
- Kochanek PM, Marion DW, Zhang W (1995): Severe controlled cortical impact in rats: assessment of cerebral edema, blood flow, and contusion volume. *J Neurotrauma* 12:1015-1025.
- Kontos HA, Povlishock JT (1986): Oxygen radicals in brain injury. *CNS Trauma* 3:257-263.
- Kraus JF, McArthur DL, Silverman TA, Jayaraman M (1997): Epidemiology of brain injury. in: Narayan RK, Wilberger JE, Povlishock JT, (eds.), *Neurotrauma*, New York: McGraw Hill, 13-30.
- Kreutzberg GW, Blakemore WF, Graeber MB (1997): Cellular pathology of the central nervous system. in: Graham DI, Lantos PL, (eds.), *Greenfield's Neuropathology*, London, Sydney, Auckland: Arnold, 85-156.

- Kroppenstedt S-N, Kern M, Thomale U-W, Schneider G-H, Lanksch WR, Unterberg AW (1999a): Effect of cerebral perfusion pressure on contusion volume following impact injury. *J Neurosurg* 90:520-526.
- Kroppenstedt S-N, Schneider G-H, Thomale U-W, Unterberg AW (1998): Protective effects of Aptiganel HCl (Cerestat) following Controlled Cortical Impact Injury in the rat. *J Neurotrauma* 15:191-197.
- Kroppenstedt S-N, Stroop R, Kern M, Thomale U-W, Schneider G-H, Unterberg AW (1999b): Lubelozole followig traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 16:629-637.
- Kuriowa T, Cahn R, Juhler M, Goping G, Campbell G, Klatzo I (1985): Role of extracellular proteins in the dynamics of vasogenic brain edema. *Acta Neuropath* 66:3-11.
- Lighthall JW (1988): Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *J Neurotrauma* 5:1-15.
- Lindgren S, Rinder L (1965): Experimental studies of head injury I. Some factors influencing results of model experiments. *Biophysik* 2:20-329.
- Liszcak TM, Hedley-White ET, Adams JF (1984): Limitations of tetrazolium salts in delineating infarcted brain. *Acta Neuropath* 65:150-157.
- Maas AI, Dearden M, Teasdale GM, et al. (1997): EBIC-guidelines for management of severe head injury in adults. European Brain Injury Consortium. *Acta Neurochir* 139:286-94.
- Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K (1994): A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg* 80:291-300.
- Marmarou A, Nakamura T, Tanaka T, Hochwald GM (1984): The timecourse and distribution of water in the resolution phase of of infusion edema. in: Go KG, Baethmann A, (eds.), *Recent progress in the study and therapy of brain edema.*, New York: Plenum, 37-44.
- Marmarou A, Tanaka T, Schulmann K (1982): The brain response to infusion edema: dynamics and resolution. in: Hartmann A, Brock M, (eds.), *Treatment of cerebral edema.*, Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 11-18.
- Marshall LF, Eisenberg HM, Jane JA (1991): The outcome of severe closed head injury. *J Neurosurg* 75:28-36.
- Martin GR, Leff P, Cambridge D (1987): Comparative analysis of two types of 5-hydroxytryptamine receptor mediating vasorelaxation: differential classification using tryptamines. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 336:365-373.
- Maxwell WL, Irvine A, Graham DI (1991): Focal axonal injury: axon response to stretch. *J Neurocytol* 20:157-164.
- Maxwell WL, Watts C, Graham DI (1993): Ultrastructural evidence of axonal shearing as a result of lateral acceleration of the head in non human primates. *Acta Neuropath* 86:136-144.
- McCall RB, Patel BN, Harris LT (1987): Effects of serotonin1 and serotonin2 receptor agonists and antagonists on blood pressure, heart rate and sympathetic nerve activity. *J Pharmacol Exp Ther* 242:1152-1159.
- McCall RB, Romero AG, Bienkowski MJ, et al. (1994): Characterization of U-92016A as a selective, orally active, high intrinsic activity 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 271:875-883.

- McIntosh TK, Noble L, Andrews B, Faden AI (1987): Traumatic brain injury in the rat: characterization of a midline fluid-percussion model. *Cent Nerv Syst Trauma* 4:119-34.
- McIntosh TK, Vink R, Noble L, et al. (1989): Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. *Neuroscience* 28:233-244.
- Meaney DF, Ross DT, Winkelstein BA, et al. (1994): Modification of the cortical impact model to produce axonal injury in the rat cerebral cortex. *J Neurotrauma* 11:599-612.
- Milhorat TH, Johnson WD, Dow Edwards DL (1989): Relationship between oedema, blood pressure, and blood flow following local brain injury. *Neurol Res* 11:29-32.
- Miller JD, Bullock R, Graham DI, Chen MH, Teasdale GM (1990): Ischemic brain damage in a model of acute subdural hematoma. *Neurosurgery* 27:433-9.
- Miller JD, Sweet RC, Narajan R, Becker D (1978): Early insults to the injured brain. *JAMA* 240:439-42.
- Mills CD, Robertson CS, Contant CF, Henley CM (1997): Effects of anaesthesia on polyamine metabolism and water content in the rat brain. *J Neurotrauma* 14:943-949.
- Monroe A (1783): Observation on the structure and function of the nervous system. in: *Creech and Johnson*, Edinburgh, 5-6.
- Muizelaar JP, Marmarou A, Young HF, et al. (1993): Improving the outcome of severe head injury with the oxygen radical scavenger polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase: a phase II trial. *J Neurosurg* 78:375-382.
- Ohata K, Marmarou A, Povlishock JT (1990): An immunocytochemical study of protein clearance in brain infusion edema. *Acta Neuropathol* 81:162-177.
- Ommaya AK, Hirsch AE, Flamm ES, Mahone RS (1966): Cerebral concussion in the monkey: An experimental model. *Science* 153:211.
- Oppenheimer DR (1968): Microscopic lesions in the brain following head injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 31:299.
- Page IH, McCubbin JW (1953): Modification of vascular response of serotonin. *AM J Physiol* 174:436-440.
- Palacios JM, Waeber C, Hoyer D, Mengod G (1990): Distribution of serotonin receptors. in: Whitaker-Azmitia PM, S.J. P, (eds.), *The neuropharmacology of serotonin.*, New York: Annals of the New York Academy of Science, 36-52.
- Palmer AM, Marion DW, Botscheller ML, Swedlow PE, Styren SD, DeKosky ST (1993): Traumatic brain injury-induced excitotoxicity assessed in a controlled cortical impact model. *J Neurochem* 61:2015-2024.
- Pant NC, Gainer H (1980): Properties of a calcium-activated protease in squid axoplasm which selectively degrades neurofilament proteins. *J Neurobiol* 11:1-12.
- Pappius HM (1974): Fundamental aspects of brain edema. in: Vinken PJ, Bruyn GW, (eds.), *Handbook Clin Neurol.*: American Elsevier, 167-185.
- Paxinos G (1986): The rat brain in stereotactic coordinates. in: San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Accosiated Press Inc.,
- Pittman RN, Wang S, DiBenedetto AJ, Mills JC (1993): A system of characterizing cellular and molecular events in programmed neuronal cell death. *J Neurosci* 13:3669-3680.

- Povlishock JT (1985): The morphopathologic responses to experimental head injuries of varying severity. in: Becker DP, Povlishock JT, (eds.), *Central nervous system trauma status report-1985.*; NINCDS Publication, 443-452.
- Povlishock JT (1992): Traumatically induced axonal injury: pathology and pathobiological implications. *Brain Pathol* 2:1-12.
- Prehn JH, Backhauss C, Karkoutly C, et al. (1991): Neuroprotective properties of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists in rodent models of focal and global cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol* 203:213-222.
- Radi R, Beckmann JS, Bush KM, Freemann BA (1991): Peroxynitrite induced membrane lipid peroxydation: The cytotoxic potetial of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 288:481-487.
- Rapoport SI (1979): Roles of cerebrovascular permeability, brain compliance, and hydraulic conductivity in vasogenic brain edema. in: Popp AJ, Bourke RS, Nelson LR, al. e, (eds.), *Neural Trauma*, New York: Raven Press, 51-62.
- Reese TS, Karnovsky MJ (1967): Fine structural localization of a blood brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34:207-217.
- Reulen HJ, Tsuyumu M, Tack A (1978): Clearance of edema fluid into cerebrospinal fluid. A mechanism for resolution of vasogenic brain edema. *J Neurosurg* 48:754-764.
- Roessner W, Tempel K (1966): Quantitative Bestimmung der Permeabilität der sogenannten Blut-Hirnschranke für Evans blau. *Med Pharmacol Exp* 14:169-182.
- Sandritter W, Jestadt R (1958): Triphenyltetrazoliumchloride (TTC) als Reduktionsindikator zur makroskopischen Diagnose des frischen Herzinfarktes. *Verh Dtsch Ges Pathol* 41:165-177.
- Saria A, Lundberg JM (1983): Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissue. *J Neurosci Meth* 8:41-49.
- Sarrafzadeh A, Thomale U-W, Kroppenstedt S-N, Unterberg A (1997): The role of melatonin following Controlled Cortical Impact Injury. *Zentralbl Neurochir Suppl* P37:56.
- Saruhashi Y, Young W (1994): Opposing effects of serotonergic 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptor agonists and antagonists on spinal axon excitability. *Neuroscience* 61:645-653.
- Sasaki S, Schneider H, Renz S (1978): Microcirculatory disturbances during the early phase following experimental spinal cord trauma in the rat. *Adv Neurol* 20:423-425.
- Schneider GH, Baethmann A, Kempfski OS (1992): Mechanisms of glial swelling induced by glutamate. *Can J Physiol Pharmacol* 70:334-343.
- Schneider GH, Hennig S, Lanksch WR, Unterberg A (1994): Dynamics of posttraumatic brain swelling following a cryogenic injury in rats. *Acta Neurochir Suppl* 60:437-439.
- Seddick Z, Habib YA (1991): The prognostic value of the brain sodium potassium ATPase enzyme concentration in head injury. *Childs Nerv Syst* 7:135-138.
- Shapira Y, Yadid G, Cotev S, Niska A, Shohami E (1990): Protective effect of MK801 in experimental brain injury. *J Neurotrauma* 7:131-139.
- Shima K, Marmarou A (1991): Evaluation of brain stem dysfunction following severe fluid percussion head injury to the cat. *J Neurosurg* 72:270-277.
- Shohami E, Novikov M, Mechoulam R (1993): A nonpsychotropic cannabinoid, HU-211, has cerebroprotective effects after closed head injury in the rat. *J Neurotrauma* 10:109-119.



- Smith ML, Auer RN, Siesjo BK (1984): The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia. *Acta Neuropathol* 64:319-332.
- Smith SL (1996): Mild pre- and posttraumatic hypothermia attenuates blood-brain barrier damage following Controlled Cortical Impact Injury in the rat. *J Neurotrauma* 13:1-9.
- Smith SL, Andrus PK, Zhang JR, Hall ED (1994): Direct measurement of hydroxyl radicals, lipid peroxidation, and blood-brain barrier disruption following unilateral cortical impact head injury in the rat. *J Neurotrauma* 11:393-404.
- Soares HD, Thomas M, Cloherty K, McIntosh TK (1992): Development of prolonged focal cerebral edema and regional cation changes following experimental brain injury in the rat. *J Neurochem* 58:1845-1852.
- Statistisches Bundesamt W (1995): Todesursachen in Deutschland. Diagnosedaten der Krankenhaus-Patienten. in: *Berichtjahre 1993-95*, Stuttgart: Metzler-Poeschel, Reihe 4-6.2.
- Staub F, Winkler A, Haberstok J, et al. (1996): Swelling, intracellular acidosis, and damage of glial cells. *Acta Neurochir Suppl* 66:56-62.
- Staub F, Winkler A, Peters J, Kempinski OS, Kachel V, Baethmann A (1994): Swelling, acidosis and irreversible damage of glial cells from exposure to arachidonic acid in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:1030-1039.
- Stover JF, Morganti-Kosmann MC, Lenzlinger PM, Stocker R, Kempinski OS, Kossmann T (1999): Glutamate and taurine are increased in ventricular cerebrospinal fluid of severely brain-injured patients. *J Neurotrauma* 16:135-142.
- Stroop R, Thomale U-W, Pauser S, et al. (1998): Magnetic resonance imaging studies with cluster algorithm for characterization of brain edema after controlled cortical impact injury (CCII). *Acta Neurochir Suppl* 71:303-305.
- Sutton RL, Hovda DA, Adelson PD, Benzel EC, Becker DP (1994): Metabolic changes following cortical contusion: relationships to edema and morphological changes. *Acta Neurochir Suppl* 60:446-448.
- Sutton RL, Lescaudron L, Stein DG (1993): Unilateral cortical contusion injury in the rat: vascular disruption and temporal development of cortical necrosis. *J Neurotrauma* 10:135-149.
- Tamura A, Graham DI, McCullough J (1981): Focal cerebral ischemia in the rat: II. Regional cerebral blood flow determined by <sup>14</sup>C-iodantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1:61-69.
- Teasdale G, Bailey I, Bell A, et al. (1992): A randomized trial of nimodipine in severe head injury: HIT I. British/finnish co-operative head injury trial group. *J Neurotrauma* 9:545-550.
- Tengvar C, Olsson Y (1982): Uptake of macromolecules into neurons from focal vasogenic cerebral edema and subsequent axonal spread to other brain regions. *Acta Neuropathol* 57:233-235.
- Tornheim PA, Prioleau GR, McLaurin RL (1984): Acute responses to experimental blunt head trauma. Topography of cerebral cortical edema. *J Neurosurg* 60:473-480.
- Unterberg A, Schneider GH, Gottschalk J, Lanksch WR (1994): Development of traumatic brain edema in old versus young rats. *Acta Neurochir Suppl* 60:431-433.
- Unterberg A, Wahl M, Baethmann A (1984): Effects of bradykinin on permeability and diameter of pial vessels in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 4:574-585.
- Unterberg AW, Lanksch WR (1994): Umfrage zur Behandlung von Patienten mit schwerem Schädel-Hirn-Trauma in Neurochirurgischen Kliniken Deutschlands. (pers. Mitteilung).

- Unterberg AW, Stroop R, Thomale U-W, Kiening KL, Päuser S, Vollmann W (1996): Characterization of brain edema following controlled cortical impact injury in rats. *Acta Neurochir Suppl* 70:106-108.
- Van den Brink WA, Marmarou A, Avezaat CJJ (1990): Brain edema in experimental closed head injury in the rat. *Acta Neurochir Suppl* 51:261-262.
- von Berenberg P, Unterberg A, Schneider GH, Lanksch WR (1994): Treatment of traumatic brain edema by multiple doses of mannitol. *Acta Neurochir Suppl* 60:531-533.
- Vorbrodt AW, Lossinsky AS, Wisniewski HM, et al. (1985): Ultrastructural observations on the transvascular route of protein removal in vasogenic brain edema. *Acta Neuropathol* 66:265-273.
- Wahl M, Schilling L, Unterberg A, Baethmann A (1993): Mediators of vascular and parenchymal mechanisms in secondary brain damage. *Acta Neurochir Suppl* 57:64-72.
- Wahl M, Unterberg A, Baethmann A, Schilling L (1988): Mediators of blood-brain-barrier dysfunction and formation of vasogenic brain edema. *J Cereb Blood Flow Metab* 8:621-634.
- Wieloch T, Koide T, Westerberg E (1986): Inhibitory neurotransmitters and neuromodulators as protective agents against ischemic brain damage. in: Kriegelstein, (eds.), *Pharmacology of cerebral ischemia*, Amsterdam: Elsevier, 191-197.
- Wiernsperger N (1990): Serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptors and brain circulation. *J Cardiovasc Pharmacol Suppl* 16:20-24.
- Yamakami I, McIntosh TK (1989): Effects of traumatic brain injury on regional cerebral blood flow in rats as measured with radiolabeled microspheres. *J Cerebr Blood Flow Metab* 9:117-124.
- Young AB, Fagg G (1990): Excitatory amino acid receptors in the brain: Membrane binding and autoradiographic approaches. *Trends Pharmacol Sci* 2:126-133.
- Young W (1992): Role of calcium in central nervous system injuries. *J Neurotrauma* 9:9-25.
- Yuan XQ, Prough DS, Smith TL, Dewitt DS (1988): The effects of traumatic brain injury on regional cerebral blood flow in rats. *J Neurotrauma* 5:289-301.
- Zhuang J, Shackford SR, Schmoker JD, Anderson ML (1993): The association of leukocytes with secondary brain injury. *J Trauma* 35:415-422.

## DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. W.R. Lanksch möchte ich für die außerordentlich freundliche Aufnahme in seiner Klinik danken.

Mein tiefer Dank gilt Herrn Prof. Dr. A.W. Unterberg. Er brachte mir die Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens nahe und war stets ein toleranter und gesprächsbereiter Lehrer für mich. Seine kritische und aufmerksame Anleitung hat sowohl diese Arbeit als auch meinen Werdegang geformt.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. K.L. Kiening. Seine äußerst hilfsbereite Anleitung bei der gemeinsamen Arbeit im Labor hat den Grundstein dieser Arbeit gelegt. Er verstand es, bei mir die Begeisterung und das Engagement für die wissenschaftliche Tätigkeit zu wecken.

Mein herzlicher Dank gilt ebenfalls Frau Prof. Dr. G. Stoltenburg-Didinger und Dr. F. van Landeghem für die kritische Anleitung bei der Durchführung der histopathologischen Untersuchungen.

Frau Kopetzki und Frau Krupke danke ich für die technische Hilfestellung.

Bedanken möchte ich mich bei Dr. A. Diers, Dr. J. v. Fallois, Dr. S. Kroppenstedt und Dr. J. Stover für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

## EIDESTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß die Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.